

**EINFLUSS VON VITAMIN D-METABOLITEN
UND METABOLITKOMBINATIONEN AUF DIE
KNOCHENDEMINERALISATION
BEIM HÜHNERKÜKEN**

Maria Völk

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Arbeit angefertigt unter Leitung von

Priv.Do. Dr.Dr.habil. W. Rambeck

EINFLUSS VON VITAMIN D-METABOLITEN

UND METABOLITKOMBINATIONEN AUF DIE

KNOCHENDEMINERALISATION

BEIM HÜHNERKÜKEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Maria Völk

aus

Bolzwang

München, 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. W. Rambeck

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. H. Gerlach

Tag der Promotion: 24. Juli 1987



drucken + binden
gmbh
Schellingstraße 23
8000 München 40
☎ 089/28 44 45

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
2. VITAMIN D ₃ -STOFFWECHSEL.....	6
2.1. Vitamin D ₃ , Bildung der wichtigsten D ₃ -Metabolite.....	6
2.2. Katabolismus und Ausscheidung der Vitamin D ₃ -Metabolite.....	10
2.3. Regulation des Vitamin D ₃ -Stoffwechsels und der Calciumhomöostase.....	12
2.4. Biologische Wirksamkeit der Vitamin D ₃ - Metabolite.....	16
2.4.1. Wirkungen am Darm.....	16
2.4.2. Wirkungen am Knochen.....	20
2.4.3. Wirkungen auf andere Zielorgane.....	27
2.5. Vitamin D ₂ -Metabolismus und biologische Wirksamkeit.....	29
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	35
3.1. Tiermaterial.....	35
3.2. Tierhaltung.....	35
3.3. Versuchsdurchführung.....	36
3.4. Verabreichte Vitamin D-Metabolite.....	38
3.5. Probenahme und Bestimmungsmethoden.....	39
4. VERSUCHSBESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE.....	43
4.1. Versuch I.....	43
4.2. Versuch II.....	50
4.3. Versuch III.....	53
4.4. Versuch IV.....	56

4.5.	Versuch V.....	59
4.6.	Versuch VI.....	63
5.	DISKUSSION.....	67
5.1.	Dosis-Wirkungsbeziehung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25,(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zur Serumcalciumerhöhung.....	67
5.2.	Calcium-Freisetzung aus den Knochen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	69
5.3.	Freisetzung von Calcium aus den Knochen durch die kombinierte Verabreichung von zwei beziehungsweise drei verschiedenen Vitamin D- Metaboliten.....	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
	SUMMARY.....	79
	LITERATURVERZEICHNIS.....	81

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Vitamin D ist seit langem als antirachitischer Faktor bekannt, aber der genaue Wirkungsmechanismus blieb lange Zeit unaufgeklärt (DeLUCA, 1979). Bereits zu Beginn des 17. Jahrhunderts fanden Whistler, De Boot und Glisson unabhängig voneinander, daß Kinder, die in verschmutzten, überfüllten Städten lebten an einer Krankheit litten, die mit intensiver Muskelschwäche und Knochendeformationen einherging (HOLICK, 1981). Mit zunehmender Industrialisierung der Städte wurde die seither als Rachitis bezeichnete Krankheit immer mehr zum Problem. Es gibt Berichte darüber, daß zu Beginn des 20. Jahrhunderts bis zu 90% der Kinder in Industriestädten, wie Boston oder London, an Rachitis erkrankt waren (HOLICK et al., 1982).

1918 berichtete MELLANBY über die Heilung von experimentell erzeugter Rachitis bei jungen Hunden durch Verabreichung von Kabeljauleberöl. Er glaubte, daß es sich bei dem antirachitischen Faktor im Kabeljauleberöl um Vitamin A handelt. Anschließend Untersuchungen von Mc COLLUM et al. (1922) zeigten jedoch, daß nicht Vitamin A für die heilende Wirkung von Rachitis verantwortlich war, sondern eine fettlösliche Substanz, die sie Vitamin D nannten. 1919 hatte HULDSCHINSKY bereits die antirachitische Wirkung von Sonnenlicht sowie auch von künstlichem Licht festgestellt. Mehr als ein Jahrzehnt später, im Jahre 1936, gelang WINDAUS et al. die Isolation und chemische Identifikation von Vitamin D₃.

Durch die prophylaktische Verabreichung von Vitamin D₃ an Mensch und Tier, kommt Rachitis heute nur mehr sehr selten vor. Durch intensive Forschung auf dem Vitamin D-Gebiet

konnten in den letzten Jahrzehnten die Kenntnisse in Bezug auf die Funktion beziehungsweise den Vitamin D-Metabolismus vielseitig erweitert werden. Einen großen Fortschritt brachte die Erkenntnis, daß Vitamin D_3 erst nach Umwandlung zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$) im Organismus wirksam ist (LUND and DeLUCA, 1966).

Heute werden Vitamin D_3 beziehungsweise D_3 -Metaboliten bei einer Reihe von Krankheiten, die den Vitamin D-Stoffwechsel betreffen, sowohl in der Tier- als auch in der Humanmedizin eingesetzt. So kann zum Beispiel die hypocalcämische Gebärpapese, eine bei Milchkühen recht häufige Störung des Mineralstoffwechsels, durch prophylaktische Verabreichung von $1,25(OH)_2D_3$ beziehungsweise von $1\alpha(OH)D_3$ zu 80% verhindert werden (JORGENSEN, 1982). Dagegen ist 24,25-Dihydroxycholecalciferol ($24,25(OH)_2D_3$), ein weiterer Metabolit des Vitamin D_3 -Stoffwechsels, bei Verabreichung von pharmakologischen Dosen in der Lage Milchfieber auszulösen (BARTON et al., 1984).

In der Humanmedizin wird $1,25(OH)_2D_3$ verstärkt zur Therapie der renal bedingten Osteodystrophie bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch mangelhafte $1,25(OH)_2D_3$ -Bildung in der Niere, erhöhte Phosphat-Retention, Hypocalcämie mit nachfolgendem sekundären Hyperparathyreoidismus und der damit verbundenen erhöhten Calciumresorption aus den Knochen. Auch bei Osteoporose, einem vor allem bei älteren Menschen, und hier besonders bei Frauen nach der Menopause auftretenden massiven Verlust von Knochenmasse, ist $1,25(OH)_2D_3$ therapeutisch nicht mehr wegzudenken. Da das häufige Auftreten von Osteoporose bei postmenopausalen Frauen angeblich in Zusammenhang mit der abnehmenden Ovarfunktion steht (JUDD and KARENMAN, 1982), wird eine kombinierte Verabreichung von Östrogen und $1,25(OH)_2D_3$ als sehr günstig angesehen

(CRILLY et al., 1981). Die Vitamin D-abhängige Rachitis Typ I, eine angeborene Störung des Knochenmetabolismus, beruht auf einem Defekt der $25\text{-OH-D}_3\text{-}1\alpha\text{-Hydroxylase}$ und läßt sich ebenfalls mit geringen täglichen Dosen von $0,5\text{ }\mu\text{g}$ bis $1\text{ }\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erfolgreich behandeln. Dagegen konnten bei der Rachitis Typ II, wo ein Rezeptordefekt der Zielorgane vorliegt, nur vereinzelt, und mit sehr hohen Dosierungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Therapieerfolge erzielt werden (KRUSE, 1985).

Trotz der mannigfachen Verwendung von $1\alpha\text{-hydroxylierten}$ D-Metaboliten in der Praxis kann die Therapie mit diesen Substanzen wegen der häufig auftretenden Nebenwirkungen nicht zufriedenstellen. So kann es zum Beispiel bei länger dauernder Therapie mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu einer Reduktion der Knochenmasse mit nachfolgender Osteopenie kommen (DELLING, 1981). Auch machen die geringe therapeutische Breite und die damit verbundene Intoxikationsgefahr den Einsatz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ schwierig.

Deshalb wurde in den letzten Jahren die Suche nach ähnlich wirksamen Substanzen, die frei von unerwünschten Nebenwirkungen sind, vorangetrieben. Dabei versprach man sich auch durch die kombinierte Verabreichung verschiedener Vitamin D_3 -Metabolite gewisse Vorteile in der Therapie von Vitamin D-abhängigen Krankheiten. Das Wünschenswerte einer kombinierten Applikation von Vitamin D-Metaboliten wäre, die benötigte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis herabsetzen zu können, dabei aber einen überadditiven Effekt auf die Calciumaufnahme im Darm bei gleichzeitigem unteradditiven Effekt auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen zu erreichen. Um dies feststellen zu können, muß jedoch jedes einzelne Zielorgan getrennt untersucht werden.

Die Wirkung einer kombinierten Verabreichung von verschiedenen Vitamin D_3 -Metaboliten am Darm ist bereits des öfteren

untersucht worden. So stellten RAMBECK und ZUCKER (1985b) bei Untersuchungen mit rachitischen Hühnerküken einen überadditiven Wirkungsanstieg (Synergismus) in Bezug auf die Bildung von calciumbindendem Protein (CaBP) im Darm durch die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fest. Auch die Untersuchung des Eischalengewichtes bei japanischen Wachteln erbrachte einen synergistischen Effekt bei gemeinsamer Gabe beider Metabolite. $1,24,25$ -Trihydroxycholecalciferol ($1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$), ein weiterer Metabolit des Vitamin D-Stoffwechsels, konnte ebenfalls eine synergistische Wirkung auf die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierte CaBP-Synthese ausüben (RAMBECK et al., 1986).

Ein Organsystem, das hinsichtlich der kombinierten Verabreichung verschiedener Vitamin D-Metabolite noch wenig untersucht ist, stellt das Skelett dar. Unsere Arbeit soll deshalb einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von Vitamin D-Metaboliten in der Calciummobilisierung aus den Knochen leisten.

In den vorliegenden Untersuchungen an Hühnerküken sollte die Calciumfreisetzung aus den Knochen nach Gabe von Vitamin D-Metaboliten und deren Kombinationen über die Erhöhung des Calciumspiegels geprüft werden. Zu vergleichen war dabei zum einen die Wirksamkeit der verschiedenen Vitamin D-Metabolite untereinander, zum andern sollte aber festgestellt werden, ob durch die kombinierte Verabreichung von Vitamin D-Metaboliten eine Potenzierung wie am Darm erfolgt, oder ob es dadurch zu einer Wirkungsabschwächung kommt. Es wurden bei den Kombinationsgruppen jeweils zwei beziehungsweise drei D-Metaboliten nebeneinander verabreicht (Zweier- und Dreierkombinationen). Bei den Zweierkombinationen wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ eingesetzt. Um die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, das synthetische Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

vergleichen zu können, wurde in einem Versuchsabschnitt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch $1(\text{OH})\text{D}_3$ ersetzt und ebenfalls mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ beziehungsweise $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert. Die Dreierkombinationen bestanden aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, und wurden in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zueinander untersucht.

Seit langem ist bekannt, daß Ergocalciferol (Vitamin D_2) beim Vogel weit weniger Wirksamkeit besitzt als Cholecalciferol (Vitamin D_3). Auch der dihydroxylierte Metabolit von Vitamin D_2 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zeigt beim Hühnerküken bezüglich der CaBP-Synthese im Darm, eine um den Faktor 8 geringere Effektivität als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, während die Wirkung beider dihydroxylierter Metabolite bei der Ratte gleich ist (RAMBECK et al., 1984).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ auf das Knochensystem beim Hühnerküken untersucht und mit der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verglichen werden.

Die Metabolite des Vitamin D_2 fanden in jüngster Zeit deshalb ein besonderes Interesse, da sie möglicherweise geringere toxische Effekte als Vitamin D_3 -Metabolite aufweisen und dadurch von therapeutischem Nutzen in der Anwendung bei Mensch und Tier sein könnten.

2. VITAMIN D₃-STOFFWECHSEL

2.1. Vitamin D₃, Bildung der wichtigsten D₃-Metabolite

Der Bedarf des Organismus an Vitamin D kann entweder über die Nahrung oder, was weitaus bedeutender ist, über Eigensynthese in der Haut gedeckt werden. Als natürlich vorkommende Nahrungsquellen von Vitamin D₃ sind lediglich Eidotter, Milchfett, bestimmte Fischlebern und deren Öle zu nennen (MILLER, 1983). Das über die Nahrung aufgenommene Vitamin D₃ wird zusammen mit den Fetten im Dünndarm absorbiert (HOLLANDER, 1981), wobei Gallensalze für diesen Vorgang nötig sind (SCHACHTER et al., 1964). In Chylomikronen inkorporiert, gelangt Vitamin D anschließend über das Pfortadersystem in die Leber (AVIOLI et al., 1967).

Bei ausreichender UV-Bestrahlung werden jedoch bis zu 90% des Vitamin D-Bedarfes durch Biosynthese in der Haut gedeckt (HADDAD and HAHN, 1973). 7-Dehydrocholesterol, die Ausgangssubstanz für die Vitamin D₃-Synthese, ist in großen Mengen im Stratum germinativum der Epidermis lokalisiert. Dort entsteht durch Absorption von Licht der Wellenlänge 250 - 300 nm mittels einer photochemischen Reaktion Provitamin D₃, ein Secosteroid, das anschließend innerhalb von 2 - 3 Tagen zu Vitamin D₃ isomerisiert. Die Umwandlung von Provitamin D₃ zu Vitamin D₃ ist temperaturabhängig. Als Nebenprodukte werden dabei Lumisterol₃ und Tachysterol₃, zwei biologisch inerte Steroide gebildet (HOLICK, 1981). Das Cholecalciferol der Haut wird rasch an das D-bindende Protein (DBP) gebunden und auf diese Weise über den Kreislauf zur Leber transportiert. Beim DBP handelt es sich um ein α -Globulin, das außer Vitamin D auch andere D-Metaboliten transportiert (BOUILLON and van BAELEN, 1981a; HOLICK and CLARK, 1978).

In der Leber erfolgt der erste Metabolisierungsschritt, nämlich die Hydroxylierung am C₂₅-Kohlenstoffatom (DeLUCA and SCHNOES, 1983). Der dabei entstehende Metabolit, 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃), ist die Hauptzirkulationsform von Vitamin D₃ im Blut. Zwei mischfunktionelle Monooxygenasen, die eine 25-Hydroxylierung katalysieren, wurden in der Leber gefunden, wobei die eine in den Mikrosomen des endoplasmatischen Retikulums, die andere in den Lebermitochondrien lokalisiert ist. Die mikrosomale Oxygenase ist die spezifischere von beiden und arbeitet bei niedrigen, physiologischen Konzentrationen von Vitamin D₃. Das mikrosomale System setzt sich aus einem Flavoprotein, vermutlich einer NADPH-abhängigen P-450-Reduktase, und Cytochrom P-450 zusammen (YOON and DeLUCA, 1980; BHATTACHARYYA and DeLUCA, 1974). Das mitochondriale Enzymsystem besteht aus einem Eisen-Schwefel-Protein, einem Flavoprotein sowie Cytochrom P-450 und führt die 25-Hydroxylierung vor allem bei hohen, pharmakologischen Konzentrationen von Vitamin D durch (BJÖRKHEM et al., 1980). Es ist nicht spezifisch für Cholecalciferol, da es auch andere Cholesterol-Hydroxylierungen katalysiert (PEDERSEN et al., 1979). Außer in der Leber wurden auch in anderen Organsystemen, wie Darm und Niere, 25-Hydroxylasen gefunden, jedoch scheint die Leber der einzige Syntheseort von physiologischer Bedeutung zu sein (TUCKER et al., 1973; OLSON et al., 1976).

25(OH)D₃ wird aus der Leber, gebunden an DBP, in die Niere transportiert, wo es das Substrat für die 25(OH)D₃-1-Hydroxylase darstellt. In der Niere wird der wichtigste Vitamin D₃-Metabolit, das 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 1,25(OH)₂D₃, gebildet (HENRY and NORMAN, 1974). Bei der 1-Hydroxylase handelt es sich angeblich um eine mischfunktionelle Monooxygenase, die aus einem Flavoprotein, einem Eisen-Schwefel-Protein (das renale Ferredoxin) und Cytochrom P-450 besteht (GHAZARIAN and DeLUCA, 1974). Das



Enzymsystem ist in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen lokalisiert (BRUNETTE et al., 1978; AKIBA et al., 1980). Neuere Untersuchungen von WARNER (1983) deuten jedoch darauf hin, daß es sich bei der 1α -Hydroxylierung auch um eine spezifische, P-450 katalysierte Peroxygenasereaktion handeln könnte.

Extrarenale 1α -Hydroxylaseaktivitäten wurden in der Plazenta von Ratte (WEISMAN et al., 1978) und Mensch (WHITSETT et al., 1981), in Knochenzellkulturen (TURNER et al., 1980; HOWARD et al., 1981), embryonalem Darmgewebe (PUZAS et al., 1983) und in Hühnerchorioallantoiszellen festgestellt (PUZAS et al., 1980). Ob es jedoch zu einer physiologisch nennenswerten extrarenalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese im nichtträchtigen Zustand kommt, ist sehr umstritten. So fanden REEVE et al. (1983) bei Untersuchungen mit nephrektomierten, nichtträchtigen Ratten, denen radioaktiv markiertes $25(\text{OH})\text{D}_3$ von hoher Spezifität verabreicht wurde, keinerlei Hinweise auf extrarenale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bildung. Dagegen stellten LITLEDIKE und HORST (1982) nach Gabe pharmakologischer Dosen von Vitamin D_3 an nephrektomierte Schweine Plasmawerte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fest, die mit denen von Kontrolltieren vergleichbar waren.

Einen weiteren, jedoch bezüglich seiner biologischen Aktivität sehr umstrittenen Metaboliten, der ebenfalls in der Niere gebildet wird, stellt 24,25-Dihydroxycholecalciferol ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) dar. Die mitochondriale 24-Hydroxylase ist eine mischfunktionelle Monooxygenase und enthält, wie die 1α -Hydroxylase, Cytochrom P-450 (KULKOWSKI et al., 1979). Von den möglichen stereochemischen Epimeren wird nur das $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synthetisiert (TANAKA et al., 1975a). Da die 24-Hydroxylase sowohl $25(\text{OH})\text{D}_3$ als auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als Substrat benützt, scheint die C_{25} -Hydroxylgruppe für die Reaktion von großer Bedeutung zu sein (TANAKA, et al.,

1977). Untersuchungen mit nephrektomierten Ratten konnten zeigen, daß die Niere nicht den einzigen Ort der $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - Synthese darstellt (GARABEDIAN et al., 1974a). 24-Hydroxylaseaktivitäten konnten auch in der Darmmukosa von Ratten (KUMAR et al., 1978) sowie in Knorpelgewebe nachgewiesen werden (GARABEDIAN et al., 1978). Die intestinale 24-Hydroxylase scheint $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als Substrat zu bevorzugen, so daß die Umwandlung zu dem weniger aktiven Vitamin D-Metaboliten $1,24,25$ -Trihydroxycholecalciferol ($1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$) eine physiologische Kontrollfunktion am Zielorgan Darm darstellen könnte (KUMAR et al., 1978). Neben dem Syntheseweg für $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Darm ist auch der in der Niere bekannt. Hier dienen, wie Untersuchungen mit Nierenhomogenaten von Küken und Ratten zeigten, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als Substrat (HOLICK et al., 1973; KLEINER-BOSSALLER and DeLUCA, 1974).

$25\text{S},26$ -Dihydroxycholecalciferol ($25\text{S},26(\text{OH})_2\text{D}_3$), ein anderer dihydroxylierter Metabolit des Vitamin D_3 -Stoffwechsels, wurde im menschlichen Plasma (PARTRIGDE et al., 1981) sowie in Nierenzellkulturen von Küken (TANAKA et al., 1978) nachgewiesen. Man nahm ursprünglich an, daß es sich bei $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ um ein Vorläuferprodukt des $25(\text{OH})\text{D}_3$ - $26,23$ -Lactons handelt, das aus dem Plasma von Küken, Ratte, Schwein und Mensch isoliert wurde (DeLUCA and SCHNOES, 1983; WICHMAN et al., 1979). Jedoch konnte bewiesen werden, daß $23\text{S},25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ das Zwischenprodukt in der Laktonbildung darstellt (TANAKA et al., 1981a). Über die biologische Rolle von $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ herrscht bis heute noch Unklarheit. Man nimmt an, daß in vivo $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ erst nach Hydroxylierung zu $1,25,26$ -Trihydroxycholecalciferol ($1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$) wirksam ist, da $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei nephrektomierten Ratten keinerlei Aktivität aufwies (LAM et al., 1975). $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ wurde sowohl in vitro als auch in vivo isoliert. So fanden TANAKA et al. (1981b) in mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

und $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ inkubierten Nierenzellkulturen große Mengen von $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$, während REINHARDT et al. (1981) diesen Metaboliten aus dem Plasma von Milchkühen, die parental hohe Dosen von Vitamin D_3 erhielten, isolieren konnten. Da $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nur eine geringe biologische Wirksamkeit aufweist, wird eine exkretorische Funktion diskutiert (TANAKA et al., 1981b).

2.2. Katabolismus und Ausscheidung der Vitamin D_3 -Metabolite

Neben $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ werden eine Vielzahl weiterer Vitamin D-Metabolite gebildet, bei denen es sich jedoch meist um Abbauprodukte der vorher genannten Substanzen handeln dürfte. Mittlerweile sind mehr als 30 Vitamin D_3 -Metabolite chemisch identifiziert worden (HENRY and NORMAN, 1984). Einen wichtigen Abbauschritt im $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stoffwechsel stellt die oxidative Spaltung der Seitenkette dar. Versuche mit Ratten konnten zeigen, daß nach Verabreichung von ^{14}C -markiertem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 20 bis 25% der Radioaktivität innerhalb von 24 Stunden als $^{14}\text{CO}_2$ in der Atemluft erschienen (HARNDEN et al., 1976). Das Hauptprodukt der Seitenkettenspaltung wurde isoliert und als 1α -Hydroxy-23-carboxy-tetranor-Vitamin D_3 oder "Calcitroic Acid" identifiziert (ESVELT et al., 1979). Wie Versuche an Ratten zeigten, befindet sich diese Substanz, außer in der Niere und im Plasma, vor allem in Leber und Darm. Sie bindet mit geringer Affinität an den intestinalen Cytosolrezeptor für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und das DBP. Auch bezüglich der Knochencalciummobilisierung und den intestinalen Calciumtransport weist sie nur geringe Aktivität auf und kann deshalb als wichtiges Ausscheidungsprodukt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ betrachtet werden (ESVELT and DeLUCA, 1981).

Als weiteres Inaktivierungsprodukt von Vitamin D_3 ist

25(OH) D_3 -26,23-Lacton zu nennen, das aus dem Plasma von Kühen, Ratten, Schweinen und Mensch isoliert werden konnte (DeLUCA and SCHNOES, 1983; WICHMAN et al., 1979). Die Synthese dieses Metaboliten erfolgt über 23S,25-(OH) $_2D_3$ (NAPOLI et al., 1982). Auch bei der Inaktivierung von 1,25(OH) $_2D_3$ scheint die Laktonbildung von Bedeutung zu sein, da in intestinalen Rattenhomogenaten dieser Metabolit aus 1,25(OH) $_2D_3$ entstand (OHNUMA and NORMAN, 1982).

Die 24-Hydroxylierung von 1,25(OH) $_2D_3$ stellt ebenfalls einen wichtigen Katabolisierungsschritt dar. 1,24,25(OH) $_3D_3$ wurde außer in der Niere (KLEINER-BOSSALLER and DeLUCA, 1974) in einer Vielzahl von Geweben (KUMAR et al., 1978; GARABEDIAN et al., 1978) sowie im menschlichen Plasma nachgewiesen (CLEMENS et al., 1981). Beim Abbau von Vitamin D_3 entsteht auch 24-keto-1,25(OH) $_2D_3$, das bei Untersuchungen mit Darmhomogenaten von Ratten entdeckt wurde. Der Metabolit kann sowohl aus 1,25(OH) $_2D_3$ als auch aus 1,24,25(OH) $_3D_3$ produziert werden. Die Substanz konnte auch in vivo aus Plasma und Darmgewebe von Ratten isoliert werden. 24-keto-1,25(OH) $_2D_3$ wird an den intestinalen Cytosolrezeptor sowie an Rezeptoren im bovinen Thymusgewebe mit der gleichen Affinität wie 1,24,25(OH) $_3D_3$ gebunden. Die biologische Funktion dieses Metaboliten ist jedoch unbekannt (NAPOLI et al., 1983).

24,25(OH) $_2D_3$ wird neben der Ausscheidung als "Calcitroic Acid" zu einer Reihe weiterer Metabolite um- und abgebaut. Dabei ist die Synthese von 24,25,26,27-tetranor-23(OH) D_3 über das Zwischenprodukt 24-oxo-25(OH) D_3 als ein wichtiger Abbauweg zu nennen. Während das Endprodukt 24,25,26,27-tetranor-23(OH) D_3 , wahrscheinlich wegen seiner verkürzten Seitenkette, keinerlei Aktivität aufweist (JONES et al., 1984), zeigt 24-oxo-25(OH) D_3 die gleiche Aktivität wie 24,25(OH) $_2D_3$ (TAKASAKI et al., 1982).

Das Hauptausscheidungsorgan für Vitamin D-Metabolite stellt die Galle dar (ONISKO et al., 1980). Neben der "Calcitroic Acid" konnten weitere biliäre Ausscheidungsprodukte isoliert werden, die sich als wasserlöslich, polar und anionisch erwiesen. Es handelt sich dabei um Sulfate und Glucosiduronate von Vitamin D und seinen Metaboliten (KUMAR et al., 1980a). Vitamin D₃-3 β -Glucosiduronate zeigten sich in Bezug auf den intestinalen Calciumtransport und die Knochencalcium-mobilisierung zwar aktiv, waren jedoch fünfmal weniger wirksam als das freie Sterol. In Systemen, die keine β -Glucuronidasereaktion besaßen, wie zum Beispiel embryonales Darmgewebe von Küken, waren sie völlig inaktiv. Dies läßt darauf schließen, daß die biologische Wirksamkeit erst nach Hydrolyse erreicht wird (NAGUBANDI et al., 1980). Vitamin D₃-3 β -Sulfate erwiesen sich als biologisch unwirksam (NAGUBANDI et al., 1981).

2.3. Regulation des Vitamin D₃-Stoffwechsels und der Calciumhomöostase

Der Vitamin D-Metabolismus unterliegt einer Reihe von Regelkreisen und Kontrollmechanismen, um seiner Aufgabe, der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase, gerecht werden zu können. Es hat sich gezeigt, daß bei erhöhtem Calciumbedarf während der Wachstumsphase (SEINO et al., 1980), der Schwangerschaft (KUMAR et al., 1979) oder Laktation (BOASS et al., 1977) die Plasmakonzentration von 1,25(OH)₂D₃ deutlich ansteigt.

Als mögliche Angriffspunkte der Regulation bieten sich die beiden Hydroxylierungsschritte in der Leber und in der Niere an. Die Rolle der 25-Hydroxylase in der Leber ist sehr umstritten. Es konnte weder in vivo (ROJANASATHIT and HADDAD, 1976) noch in vitro (BJÖRKHEM and HOLMBERG, 1979) eine Pro-

dukthemmung auf die 25-Hydroxylase nachgewiesen werden. Da bei Hypervitaminose D sehr hohe Konzentrationen von $25(\text{OH})\text{D}_3$ im Plasma ohne eine Veränderung im $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel gefunden werden, nimmt man an, daß $25(\text{OH})\text{D}_3$ den toxischen Effekt von Vitamin D bewirkt (HUGHES et al., 1976). Andererseits wurde durch kinetische Messungen eine steigende Substrataffinität der 25-Hydroxylase bei Vitamin D-Mangel festgestellt (DELVIN et al., 1978). Neueren Untersuchungen zufolge soll jedoch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Hemmung der 25-Hydroxylaseaktivität in der Leber bewirken (BELL et al., 1984).

Den wichtigsten regulatorischen Schritt stellt die Beeinflussung der renalen Hydroxylasen dar. Dabei sind als bedeutendste Regulatoren der 1α -Hydroxylase der Calcium- und Phosphatgehalt im Blut, Parathormon und die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration selbst zu nennen (DeLUCA and SCHNOES, 1983). Bei Hypocalcämie wird Parathormon sezerniert und an Rezeptoren in Knochen und Niere gebunden (DeLUCA, 1974). In der Niere hemmt es die Reabsorption von Phosphat (RAISZ, 1981) und stimuliert das 1α -Hydroxylasesystem, worauf es zu einer gesteigerten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese kommt (DeLUCA and GHAZARIAN, 1980). Gleichzeitig wird die $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion durch Hemmung der 24-Hydroxylase unterdrückt (TANAKA et al., 1975b). Zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fördert Parathormon die Rückresorption von Calcium in der Niere, die Calciumfreisetzung aus den Knochen und, parathormonunabhängig, den intestinalen Calcium- und Phosphattransport. Die daraus resultierende Normalisierung des Serumcalciumspiegels bewirkt durch einen negativen Feed back Mechanismus den Rückgang der Parathormonsekretion und die damit verbundene sinkende $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion (NORMAN, 1979a).

Bei hypercalcämischen Zuständen dagegen, wird durch den erhöhten Calciumgehalt des Blutes die Parathormonsekretion unterdrückt, die 1α -Hydroxylierung gehemmt sowie die

24-Hydroxylase stimuliert (DeLUCA, 1981). Außerdem wird als gegenregulatorische Maßnahme Calcitonin aus den parafollikulären Zellen der Schilddrüse sezerniert, das die Knochenresorption durch Beeinflussung der Osteoklastentätigkeit hemmt und somit zu einer Senkung des Calciumspiegels beiträgt (MUNSON and HIRSCH, 1966).

Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration selbst beeinflusst in hohem Maße die renalen Hydroxylasen. Bei steigendem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel wird die 24-Hydroxylase stimuliert, die 1-Hydroxylase jedoch gehemmt (TANAKA and DeLUCA, 1974). Eine Veränderung beider Enzymaktivitäten durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann nach Verabreichung von Proteininhibitoren, wie Cycloheximid und Aktinomycin D, gehemmt werden, was für die Notwendigkeit einer Proteinsynthese bei diesem Vorgang spricht (HENRY, 1979).

Auch der Phosphatgehalt des Blutes beeinflusst den Vitamin D-Metabolismus. Bei Hypophosphatämie steigt der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Blutspiegel durch direkte Stimulation der 1-Hydroxylase an, während es bei Hyperphosphatämie zu einem Abfall der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese bei gleichzeitig ansteigender $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion und Parathormonsekretion kommt (PARSONS, 1978).

Neben den erwähnten Vitamin D-Steuerungsmechanismen scheinen noch zusätzliche Kontrollen zu existieren, die vor allem in Zeiten erhöhten Bedarfes, wie Wachstum, Trächtigkeit, Laktation oder bei Vögeln während der Legeperiode den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel beeinflussen.

Östrogen allein oder in Kombination mit Testosteron oder Progesteron stimuliert die 1-Hydroxylaseaktivität und damit die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese (PIKE et al., 1978). Neuere Untersuchungen zeigen, daß Östrogen den Plasmacalciumspiegel durch verstärkte Calciumfreisetzung aus dem Skelett erhöht,

während bei Testosteron kein Effekt festzustellen ist (KHANDEKAR et al., 1986). Der genaue Wirkungsmechanismus von Östrogen ist unbekannt. Es wird ein indirekter Einfluß über eine Erhöhung des DBP-Spiegels (BOUILLON et al., 1981b) beziehungsweise über eine Steigerung der Anzahl der Parathormonrezeptoren in der Niere diskutiert (FORTE et al., 1983).

Die Hypophyse scheint ebenfalls eine Rolle in der Regulation des $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Metabolismus zu spielen. Für Prolaktin konnte ein stimulierender Effekt auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bildung bisher nur beim Kücken nachgewiesen werden (SPANOS et al., 1976), nicht jedoch bei der Ratte (MATSUMOTO et al., 1979). Beim Menschen soll es entgegen früheren Untersuchungen doch zu einer prolaktinbedingten Stimulierung der 1α -Hydroxylase während der Laktation kommen (HAINING et al., 1986). Hypophysektomie bei Ratten resultiert in erniedrigten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - und ansteigenden $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen; die nachfolgende Verabreichung von Wachstumshormon (STH) bewirkt den umgekehrten Effekt (SPENCER and TOBIASSEN, 1981). Dagegen konnte bei Kindern, die an STH-Mangel litten, keine Wirkung auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmakonzentration festgestellt werden (GERTNER et al., 1979).

Sehr umstritten ist die Beziehung zwischen Glukokortikoiden und Vitamin D. Bei Langzeitbehandlung mit Glukokortikoiden oder erhöhten Serumwerten über längere Zeit, kann es zu starkem Knochengewichtsverlust durch abnehmende Knochenformation bei ansteigender Knochenresorption kommen (SCHAADT and BOLER, 1978). Fest steht, daß unter Kortikosteroideinfluß die Calciumabsorption aus dem Darm abnimmt. Als mögliche Ursachen dafür kommen mangelnde $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Bildung (AVIOLI et al., 1968), herabgesetzte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese (EDELSTEIN et al., 1977), direkte Beeinflussung der Carrierproteinsynthese (AVIOLI and HAHN, 1978) sowie Änderung der

Rezeptorenzahl am Zielorgan (HIRST and FELDMAN, 1982) in Betracht. COLETTE et al. (1986) konnten jedoch vor kurzem zeigen, daß es unter langfristiger Kortikosteroidbehandlung zu einer Beschleunigung des $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Metabolismus kommt, während die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bildung unbeeinflusst bleibt.

2.4. Biologische Wirksamkeit der Vitamin D_3 -Metabolite

Es ist seit langem bekannt, daß es bei Vitamin D-Mangel zu Störungen der Calciumhomöostase mit nachfolgender Beeinträchtigung der Skelettmineralisation kommt. Die Rolle für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Aufrechterhaltung der Homöostase ist unbestritten, während für andere Vitamin D-Metabolite noch kontroverse Ansichten existieren. Die Wirkung von Vitamin D und seinen Metaboliten wird durch Interaktion mit den sogenannten Zielorganen vermittelt, wobei Darm, Knochen und die Niere die drei klassischen Erfolgsorgane von Vitamin D darstellen. Es wurden inzwischen auch Rezeptoren in zahlreichen anderen Geweben gefunden, die für eine Wirkung von Vitamin D in diesen Organen sprechen (HENRY and NORMAN, 1984).

2.4.1. Wirkungen am Darm

Das bedeutendste und am besten untersuchte Zielorgan für Vitamin D stellt der Darm dar. Im Darm kommt es unter Einwirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, der wirksamen Form von Vitamin D_3 , zu einer Stimulierung der Calcium- und Phosphatabsorption aus dem Darmlumen (ADAMS and NORMAN, 1970).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entspricht der klassischen Hormondefinition. In der Niere synthetisiert, wird es über den Blutweg zu seinen Wirkungsorten transportiert, wo es zur Interaktion mit dem Genom der Zielzelle kommt (NORMAN, 1984). Die Zielorgane zeichnen sich durch das Vorhandensein von spezifischen,

hochbindungsfähigen Rezeptoren aus. TSAI und NORMAN (1973) konnten zum ersten Mal Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aus dem Cytoplasma von Darmzellen bei Küken isolieren. Gebunden an diese Rezeptoren, gelangt das Hormon in den Zellkern, wo es zur Synthese von m-RNA mit nachfolgender Proteinbiosynthese eines spezifischen, calciumbindenden Proteins (CaBP) kommt (CHARLES et al., 1981).

WASSERMAN und TAYLOR (1966) berichteten erstmals über dieses Vitamin D-abhängige CaBP in der Darmmukosa. Inzwischen sind weitere calciumbindende Proteine aus verschiedenen Geweben bei unterschiedlichen Tierarten isoliert worden (NORMAN, 1984). Über die genaue Rolle des CaBP beim intestinalen Calciumtransport herrscht noch Unklarheit; man nimmt an, daß es für den Transport von Calcium durch die Zelle von Wichtigkeit ist und die Zelle vor zu hohen Calciumkonzentrationen schützt (DeLUCA and SCHNOES, 1983). In Widerspruch dazu stand lange Zeit das Auftreten von CaBP erst mehrere Stunden nach Beginn des durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierten Calciumtransportes (SPENCER et al., 1976). Neuere Untersuchungen von BISHOP et al. (1983) konnten jedoch nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Verabreichung das Erscheinen von CaBP bereits 2 Stunden vor Beginn einer nennenswerten Calciumabsorption nachweisen.

Außer den Calciumtransfer durch die Zelle beeinflusst $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch die weiteren Phasen des intestinalen Calciumtransportes. Der Eintritt von Calcium in die Zelle an der Bürstensaummembran erfolgt durch Diffusion; dabei soll $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diesen Vorgang durch Änderung der Lipidzusammensetzung und nachfolgende Permeabilitäts-erhöhung der Membran erleichtern (KREUTTER et al., 1983). Die Ausschleusung von Calcium aus der Zelle in das Kreislaufsystem an der basolateralen Membran wird unter $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Einwirkung durch Stimulierung einer ATP-aktivierten Calciumpumpe forciert (GHIJEN and Van OS, 1982). Nach neuesten Ergebnissen

könnte jedoch die von vielen Autoren beschriebene, schnelle Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Darmzelle durch folgende Mechanismen erklärbar sein: zum einen durch Änderung im polyamin-Metabolismus der Zelle (LUCAS et al., 1986) und zum andern durch Stimulierung des Calciumtransportes mittels Endo- und Exozytose. Nach dem Einschluß von Calcium an der Bürstensaummembran in Endozytosevesikel und anschließender Fusion mit Lysosomen, soll es zur Verschmelzung mit der basolateralen Membran und damit zur Entleerung des Vesikelinhaltes kommen (NEMERE and NORMAN, 1986).

Im Darm werden außer CaBP noch weitere Proteine synthetisiert (WASSERMAN and FULLMER, 1983), jedoch stellt das CaBP den am besten meßbaren Parameter dar. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Verabreichung von Vitamin D beziehungsweise seinen Metaboliten und der CaBP-Konzentration. So konnte in der Darmmukosa von Vitamin D-mangelernährten Ratten und Küken kein CaBP nachgewiesen werden (NORMAN et al., 1982). Bezüglich der Induktion der CaBP-Synthese erwies sich $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als der wirksamste aller Vitamin D-Metabolite (FRANCESCHI and DeLUCA, 1981).

Die Ansichten über die physiologische Bedeutung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, der Hauptzirkulationsform von $25(\text{OH})\text{D}_3$ unter normocalcämischen Bedingungen, sind sehr kontrovers. Für eine Rolle in der Calciumhomöostase spricht, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in allen Testsystemen, in denen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirksam ist, ebenfalls eine Wirkung besitzt. Die benötigte Dosis ist jedoch um ein Vielfaches höher (KANIS et al., 1982). Dagegen sprechen Untersuchungen mit $24,24\text{-F}_2\text{-}25(\text{OH})\text{D}_3$, einer Substanz, die nicht 24-hydroxyliert werden kann. Es zeigte sich, daß dieser diflourierte Metabolit alle Funktionen von Vitamin D erfüllen kann (DeLUCA and SCHNOES, 1983). BOYLE et al. (1973) berichteten erstmals über die biologische Wirksamkeit von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Es wurde jedoch schon sehr früh

in Frage gestellt, ob $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst oder erst nach Umwandlung zu einem polareren Metaboliten wirksam ist. So konnten THOMASSET et al. (1978) nach Verabreichung pharmakologischer Dosen von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an nephrektomierte Ratten keine CaBP-Synthese im Darm feststellen. Sie schlossen daraus, daß nicht $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sondern $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ für das Hervorbringen der biologischen Antwort verantwortlich ist. In Widerspruch dazu stehen Untersuchungsergebnisse von KANIS et al. (1978), die bei nierenlosen Menschen nach Gabe niedriger $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen eine Erhöhung des intestinalen Calciumtransportes nachweisen konnten. Auch CUNDY et al. (1979) kamen zu dem Schluß, daß die biologische Wirksamkeit von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beim Menschen nicht durch die Bildung von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ vermittelt wird.

In experimentellen Studien konnte in etwa folgende Reihenfolge für die biologische Aktivität der verschiedenen Vitamin D-Metabolite festgestellt werden:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 = 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3 > 25(\text{OH})\text{D}_3 > \text{D}_3 > 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
(OKAMURA et al., 1974; HOLICK et al., 1976).

Über die Rolle von $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Vitamin D-Metabolismus herrscht ebenfalls noch Unklarheit. Es ist bereits bekannt, daß 26-Hydroxylierung die biologische Wirksamkeit von $25(\text{OH})\text{D}_3$ herabsetzt (LAM et al., 1975). In Untersuchungen mit Ratten erwiesen sich bezüglich der CaBP-Synthese $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als gleich wirkungsvoll, waren jedoch 10 bis 15 mal weniger effektiv als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Wurden diesselben Substanzen den Tieren nach Nephrektomie verabreicht, war kein CaBP nachzuweisen, was für die Notwendigkeit der C_1 -Hydroxylierung für das Erreichen ihrer biologischen Wirksamkeit spricht (THOMASSET et al., 1979). $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnte zwar den intestinalen Calciumtransport, gemessen mittels eines "everted gut sac", signifikant steigern, war aber nur 1/50 bis 1/100 so wirksam wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die 26-Hydroxylierung könnte deshalb

für eine bis jetzt noch unbekannte Vitamin D-Wirkung von Bedeutung sein, oder, was wahrscheinlicher ist, als initialer Schritt in der Inaktivierung hochwirksamer Vitamin D-Metabolite angesehen werden (TANAKA et al., 1981b).

Besonderes Augenmerk richtete sich in den letzten Jahren auf die kombinierte Verabreichung von Vitamin D-Metaboliten. So konnte durch das Hinzufügen selbst kaum wirksamer Konzentrationen von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine signifikante Erhöhung des CaBP erreicht werden, die über die Summe der Einzelwirkungen hinausging. Dieser sogenannte "synergistische" Effekt ist am deutlichsten bei einem Verhältnis von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ von 1:10 (RAMBECK et al., 1985a). Die Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ erbrachte ebenfalls in Bezug auf die CaBP-Bildung eine sich gegenseitig stimulierende, überadditive Wirkung (RAMBECK et al., 1986).

Durch die gezielte Kombination zweier Vitamin D-Metabolite könnte es künftig möglich werden, die Dosierung des sehr leicht toxisch wirkenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Therapie renaler Osteodystrophien zu verringern, was von großem therapeutischem Nutzen wäre.

2.4.2. Wirkungen am Knochen

Das zweite wichtige Zielorgan der Vitamin D-Metabolite stellt das Skelett dar. Obwohl über die Wirkung am Knochen weniger bekannt ist als über die Darmwirkung, ist die Notwendigkeit von Vitamin D für den wachsenden und adulten Organismus unbestritten, da es bei Vitamin D-Mangel zu Knochenmineralisationsstörungen mit Osteoidakkumulation und mangelhafter Ossifikation kommt. Ob es sich bei der anti-rachitischen Wirkung von Vitamin D beziehungsweise dessen Metaboliten um einen direkten Effekt handelt ist fraglich; diskutiert wird auch eine indirekte Wirkung über die Erhö-

hung des Calcium- und Phosphatblutspiegels nach Vitamin D-Verabreichung (FRASER, 1981).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist seit langem als ein sehr wirksamer Stimulator der durch Osteoklasten vermittelten Calciumfreisetzung aus den Knochen bekannt (RAISZ et al., 1972). Die Calcium-mobilisierung aus den Knochen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erfordert die Anwesenheit von Parathormon (GARABEDIAN et al., 1974b). Untersuchungen mit fetalen Rattenkalvarien in vitro konnten zeigen, daß es durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu einer Reduzierung der Kollagen- und Prokollagen-mRNA-Synthese um mehr als 50% kommt, was für das Eingreifen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Transkriptionsebene spricht (ROWE and KREAM, 1982). Die Notwendigkeit einer Proteinsynthese wurde auch von TANAKA und DeLUCA (1971) demonstriert, die eine Hemmung der Calcium-mobilisierung nach Gabe von Aktinomycin D feststellten. Die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulierte Knochenresorption kann entweder durch Beeinflussung der Zelldifferenzierung oder der Osteoklastenentwicklung vermittelt werden. Es wurde berichtet, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Differenzierung von menschlichen, myeloischen Leukämiezellen in Monozyten und Makrophagen, die vermeintlichen Vorläuferzellen von Osteoklasten, induziert (KO and BERNARD, 1981; TANAKA et al., 1982). Diese Zellen können jedoch auch ohne Weiterentwicklung zu Osteoklasten Knochenresorption verursachen, wie Versuche mit devitalisierter Knochenmatrix zeigten (BURGER et al., 1982). In späteren Studien mit Knochenmarkszellkulturen von Katzen konnte man ebenfalls nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Verabreichung eine Förderung der Differenzierung von Monozytenvorläuferzellen und eine anschließende Fusion in vielkernige osteoklastenähnliche Zellen nachweisen (PHAROAH and HEERSCHKE, 1985). Dabei fungieren Polyamine als wichtige, intrazelluläre Mediatoren der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung. Die Fusion der Vorläuferzellen zu Osteoklasten kann durch Cycloheximid und Interferon- γ gehemmt, durch Vitamin A dagegen stimuliert werden (SUDA,

1986). Zum gegenteiligen Ergebnis kamen jedoch HOLTROP und RAISZ (1979), die in Knochenzellkulturen von Ratten keine Erhöhung der Osteoklastenzahl nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gabe feststellten, während Parathormon zu einem schnellen Anstieg dieser Zellen führte. Dies stimmt überein mit neueren Untersuchungen von MALLUCHE et al. (1986), wonach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Erhöhung der Knochenzellaktivität, Parathormon dagegen eine Stimulierung der Zellzahl bewirkt.

Der genaue Wirkungsmechanismus von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Osteoklasten ist unbekannt, da Osteoklasten keine Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aufweisen. Dagegen konnten bei Osteoblasten und deren Vorstufen Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nachgewiesen werden (NARBAITZ et al., 1983). Man vermutet deshalb ein für den Vorgang der Knochenresorption notwendiges und bis dato unbekanntes Verbindungssystem zwischen Osteoblasten und Osteoklasten (NIJWEIDE et al., 1986). Eine mögliche Erklärung für die Art der Verbindung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten könnte die Bildung von Osteocalcin (Bone Gla Protein), einem nicht kollagenen Protein der Knochenmatrix, darstellen. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert die Synthese dieses Proteins durch Osteoblasten in vitro (BERESFORD et al., 1984). Osteocalcin wirkt chemotaktisch auf Monozyten, die mutmaßlichen Vorstufen von Osteoklasten (MALONE et al., 1982). Außerdem soll dieses Protein auch eine hemmende Wirkung auf die Knochenmineralisation ausüben (PRICE, 1983). Osteoklasten scheinen ebenfalls keine Rezeptoren für Parathormon zu besitzen, da bei in vitro Versuchen die Aktivierung von Osteoklasten durch Parathormon an die Anwesenheit von Osteoblasten gebunden war (WONG, 1984). Im Gegensatz dazu konnten Calcitoninrezeptoren in Osteoklasten nachgewiesen werden. In vivo Verabreichung von Calcitonin reduziert innerhalb von 30 Minuten die Osteoklastenzahl in Rippen von Ratten und führt so zu einer Senkung des Serumcalciumspiegels (HEDLUND et al., 1983).

Außer $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ werden auch andere Vitamin D-Metabolite an den cytosolischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor gebunden, aber mit wesentlich geringerer Affinität. Die Wirksamkeit der Vitamin D-Metabolite in der Stimulation der Knochenresorption ist korreliert mit ihrer Affinität zum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor. In Bezug auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen bei Ratte und Maus konnte folgende Reihenfolge bei den natürlichen Vitamin D-Metaboliten festgestellt werden:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3 > 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3 > 25(\text{OH})\text{D}_3 > 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3 > \text{D}_3$
(STERN, 1981).

Bei Untersuchungen mit thyroparathyroektomierten Ratten wurde ebenfalls die Freisetzung von $^{45}\text{Calcium}$ aus den Knochen durch Verabreichung verschiedener Vitamin D-Metabolite gemessen. Die Tiere zeigten eine dosisabhängige, signifikante Erhöhung des $^{45}\text{Calcium}$ spiegels im Serum ab 40 ng $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und darüber. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, das synthetische Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, war erst bei einer Dosis von 100 ng pro Tier wirksam. $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnte zwar eine $^{45}\text{Calcium}$ freisetzung aus den Knochen erzielen, erforderte aber eine Dosis von 1 μg . Vitamin D_3 , $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ waren, sogar bei der relativ hohen Dosierung von 40 μg und Messungen bis zu 72 Stunden nach Verabreichung der Substanzen, unwirksam (BORIS et al., 1980).

Über die Knochencalciummobilisierung beim Hühnerküken liegen wesentlich weniger Arbeiten als bei der Ratte vor. Es ist aber sehr schwierig, die Ergebnisse zu vergleichen, da oft unterschiedliche Versuchsanordnungen, Dosierungsbereiche sowie Verabreichungsformen gewählt wurden. Wichtig ist bei Messungen der Calciumfreisetzung aus den Knochen, exogene Calciumquellen auszuschalten, was durch eine calciumfreie Diät am Ende der Versuchsperiode gewährleistet ist. Eine diese Voraussetzung berücksichtigende Arbeit stammt von WONG et al. (1972), die nach 3 Wochen Vitamin D-freier Ernährung in der Vorperiode 3 weitere Tage calciumfreie Diät verab-

reichten, ehe sie die Vitamin D-Metabolite intrakardial applizierten. Bei der anschließenden Aktivitätsmessung durch Feststellung des Serumcalciumspiegels fanden sie nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Verabreichung bereits nach 8 Stunden eine maximale Erhöhung des Serumcalciums, während dies bei $25(\text{OH})\text{D}_3$ und D_3 erst nach 20 bis 24 Stunden der Fall war. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwies sich dabei 5,5 mal wirksamer als D_3 und war 3,6 mal so wirksam wie $25(\text{OH})\text{D}_3$. In einer gleichzeitig durchgeführten Studie mit nephrektomierten Ratten wurde die Notwendigkeit der 1α -Hydroxylierung für die Knochencalciummobilisierung dadurch festgestellt, daß $25(\text{OH})\text{D}_3$ und D_3 keinerlei Wirkung zeigten.

Sehr unterschiedliche Meinungen gibt es auch über die Beteiligung der Vitamin D-Metabolite am Mineralisationsprozeß. Dies gilt vor allem für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, einem bezüglich seiner Wirksamkeit sehr umstrittenen Metaboliten. BROMMAGE et al. (1983) infundierten Ratten mit Vitamin D-Mangel $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $24,24\text{-F}_2\text{-}25(\text{OH})\text{D}_3$ und stellten anschließend die Skelettmineralisation durch Bestimmung von organischem Gewicht und Aschegewicht des Femurs fest. Im Gegensatz zu einer Kontrollgruppe, die kein Vitamin D erhielt, wiesen beide Gruppen voll mineralisierte Knochen mit gleichen Femuraschegewichten auf. Da $24,24\text{-F}_2\text{-}25(\text{OH})\text{D}_3$ nicht 24-hydroxyliert werden kann, scheint $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und nicht $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für eine vollständige Knochenbildung nötig zu sein. Zum gleichen Ergebnis kamen auch PARFITT et al. (1984), die nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Verabreichung an Ratten normales Knochenwachstum und -entwicklung beobachten konnten. Sie schlossen daraus, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den einzig wichtigen Metaboliten bei der Ratte darstellt. In einer Studie mit rachitischen Hühnerküken untersuchten DICKSON et al. (1984) ebenfalls $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf ihre antirachitische Wirkung. Zu diesem Zweck wurden biochemische Plasmaparameter, Knochenhistologie und -morphologie, Mikroradio-

graphie und Knochenmineralisation beurteilt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte die meisten der biochemischen und histologischen Veränderungen, die bei Rachitis auftreten, heilen beziehungsweise verhindern, während $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nur eine geringe antirachitische Effektivität aufwies. Die Alkalische Phosphatase blieb hoch und die Knochen waren nicht genügend mineralisiert und histologisch verändert. Auch bei kombinierter Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war keine gegenseitig potenzierende Wirkung festzustellen, jedoch zeigten die mikroradiographischen Ergebnisse eine geringgradige Förderung der Mineralisation subperiostaler Trabekel.

Neben den oben aufgeführten Untersuchungen gibt es jedoch eine Reihe von Arbeiten, die $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine wichtige Rolle in der Knochenmineralisation zusprechen. Bei Menschen mit nutritiv bedingter Osteomalazie konnte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nur eine geringgradige Verbesserung der Mineralisation bewirken, während bei zusätzlicher Verabreichung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Normalisierung der Knochenmineralisation eintrat (BORDIER et al., 1978).

ORNOY et al. (1978) berichteten, daß die alleinige Gabe von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an Küken das Auftreten von Rachitis zwar verhinderte, die Knochenstruktur jedoch histologisch geringfügige Abnormitäten aufwies. Sie führten dies auf den erniedrigten Serumcalciumspiegel der behandelten Tiere zurück. Wurde dagegen eine Kombination aus $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ gegeben, war auch histologisch eine vollständige Heilung der Rachitis festzustellen.

Beide dihydroxylierten Metabolite werden auch für eine Verbesserung der Frakturheilung benötigt (DEKEL et al., 1983) sowie für die Überwindung der Skelettresistenz gegenüber Parathormon, wie sie bei Hunden mit Urämie auftritt (MASSRY et al., 1979).

Für eine eigenständige Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spricht die Entdeckung von eigenen Rezeptoren für diesen Metaboliten. CORVOL et al. (1979) fanden Rezeptoren in Gewebekulturen von Chondrozyten der Wachstumszone bei Kaninchen und SÖMJEN et al. (1982a und 1982b) wiesen spezifische Rezeptoren in enchondralen Knochen von Vitamin D-depletierten, neugeborenen Ratten sowie in mesenchymalen Zellen aus Gliedmaßenanlagen von Kükenembryonen nach. $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert auch die DNA- und Proteoglykansynthese in Chondrozytenzellkulturen von Ratte und Kaninchen (CORVOL et al., 1978). Ferner steigert es die DNA-Synthese und die Ornithindecaboxylaseaktivität in Epi- beziehungsweise Diaphyse von Ratten (SÖMJEN et al., 1983) und hemmt die Knochenresorption bei Ratte und Mensch (PAVLOVITCH, et al., 1981; LLACH et al., 1979). Der genaue Einfluß von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf Knochenbildung und -mineralisation bedarf noch näherer Klärung. Ergebnisse von WIENTROUB und REDDI (1982) lassen vermuten, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vor allem während der Chondrogenese und beim Knochenaufbau von Bedeutung ist, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dagegen beim Knochenumbau eine Rolle spielt.

Gegen eine direkte Wirkung von Vitamin D auf das Knochensystem sprechen Untersuchungen von UNDERWOOD und DeLUCA (1984), die Vitamin D-depletierten Ratten 10 Tage lang kontinuierlich Calcium- und Phosphorlösung infundierten und gleiches Knochenwachstum sowie gleiche Knochenmineralisation wie bei Vitamin D-repletierten Tieren feststellten. Sie sprachen deshalb Vitamin D eine indirekte Wirkung auf die Knochenentwicklung über die Erhöhung des Serumcalcium- und Serumphosphorspiegels zu.

Über die Wirkung von $25,26(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ auf das Knochensystem ist relativ wenig bekannt. Von besonderem Interesse ist der Einfluß auf die Knochenmineralisation, die beim Einsatz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Therapie verschiedener Krankheiten, wie zum Beispiel

postmenopausaler Osteoporose oder Nephropathien, als unerwünschter Nebeneffekt in Erscheinung tritt.

Da $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ in Bezug auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen weit weniger wirksam sind als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, könnte die Anwendung von Kombinationspräparaten gewisse Vorteile hinsichtlich der unerwünschten Nebenwirkungen bringen.

2.4.3. Wirkungen auf andere Zielorgane

Die Niere ist außer Syntheseort auch Zielorgan für Vitamin D-Metabolite. Unter Einwirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird die tubuläre Reabsorption von Calcium und Phosphat stimuliert (HENRY and NORMAN, 1984). Es gelang sogar, ein spezifisches CaBP in der Niere bei mehreren Tierarten nachzuweisen (TAYLOR et al., 1982).

Die Parathyreoidea stellt ein wichtiges Regulationsorgan der Calciumhomöostase dar. Rezeptoren konnten sowohl für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BRUMBAUGH et al., 1975) als auch für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (MERKE and NORMAN, 1981) nachgewiesen werden. HENRY et al. (1977) demonstrierten die Notwendigkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, um eine Regression der hypertrophen Parathyreoidea bei Vitamin D-Mangel zu erreichen, während MIRAVET et al. (1981) bereits nach alleiniger Gabe von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Hemmung der Parathormonsekretion feststellen konnten.

An Basalzellen der Epidermis wurden nicht nur Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ festgestellt (MERKE et al., 1985a), sondern es konnte sogar ein spezifische CaBP nachgewiesen werden (RISK et al., 1984). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ soll in der Haut die Akkumulation von 7-Dehydrocholesterol, dem Ausgangsprodukt der Vitamin D_3 -Synthese, bewirken. Ob dies durch Ansteigen der Synthese oder durch verlangsamten Metabolismus geschieht, ist nicht

bekannt (ESVELT et al., 1980). Außerdem soll es einen stimulierenden Einfluß auf die Keratozytendifferenzierung ausüben und auch die Melanogenese, die einen wichtigen Regulationsfaktor in der Vitamin D_3 -Synthese der Haut darstellt, erhöhen (SMITH and HOLICK, 1985; OIKAWA and NAKAYASU, 1974).

Bei Vögeln sind Vitamin D-Metabolite für die Eibildung und den Schlupf der Küken unbedingt erforderlich. Hennen, die als einzige Vitamin D-Quelle $1,25(OH)_2D_3$ bekamen, produzierten zwar fruchtbare Eier, die sich entwickelnden Embryonen waren jedoch unfähig zu schlüpfen. Erst nach Ergänzung der Diät mit $24,25(OH)_2D_3$ konnte eine normale Schlupfrate erzielt werden (HENRY and NORMAN, 1978). Auch durch Hinzufügen von $24,24-F_2-25(OH)D_3$ oder $25(OH)D_3$ zur Diät konnte die Schlupfrate auf 90 bis 100% erhöht werden, was die Notwendigkeit von $24,25(OH)_2D_3$ für eine vollständige Reproduktion widerlegt (AMEENUDIN et al., 1982). Da nach Injektion von $1,25(OH)_2D_3$ in das Ei eine normale Schlupffähigkeit erreicht werden kann, nehmen SUNDE et al. (1978) ein Transportproblem für $1,25(OH)_2D_3$ in das Ei an.

Auch das Immunsystem scheint ein Angriffspunkt für $1,25(OH)_2D_3$ zu sein. Es stimuliert zusammen mit T-Zellfaktoren die Bildung von Interleukin 1, das dann nachfolgend, wiederum mit anderen Faktoren, die T-Lymphozyten aktiviert (AMENTO et al., 1984). Bei aktivierten T-Lymphozyten unterbindet $1,25(OH)_2D_3$ die Bildung von Interleukin 2 und verhindert dadurch eine unkontrollierte Ausweitung der Immunantwort (TSOUKAS et al., 1984). Außerdem wird durch $1,25(OH)_2D_3$ die Produktion der Immunglobuline IgG und IgM gehemmt (LEMIRE et al., 1984).

Vitamin D-Metabolite spielen möglicherweise auch bei der Karzinogenese eine Rolle. So konnte nach epikutaner Anwendung von Karzinogenen und nachfolgender lokaler Gabe von

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Verstärkung des Tumorwachstums beobachtet werden (SUDA, 1985). Hingegen stellten SATO et al. (1984) bei Untersuchungen mit tumorbefallenen Ratten nach Verabreichung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ eine Reduktion der Metastasenbildung und -entwicklung in Lunge und Lymphknoten fest.

Weitere wichtige Organsysteme, in denen Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nachgewiesen wurden, sind die β -Zellen des Pankreas (LJUNGHALL et al., 1985), Skelett- und Herzmuskel (SIMPSON et al., 1985) sowie Hoden und Ovar (MERKE et al., 1985b; DOKOH et al., 1983).

2.5. Vitamin D_2 -Metabolismus und biologische Wirksamkeit

Vitamin D_2 (Ergocalciferol) ist das in Pflanzen, Pilzen und Hefen vorkommende Vitamin D. Es entsteht durch UV-Bestrahlung aus Ergosterol. Da es vor allem in Hefen in reichlicher Menge vorhanden ist, dienten diese lange Zeit als bevorzugte Vitaminquelle zur Anreicherung menschlicher und tierischer Lebensmittel (MILLER, 1983). Trotz des starken Einsatzes in der Lebensmittelindustrie und zur Vitamingergänzung betrug der Anteil von Vitamin D_2 beziehungsweise dessen Metaboliten am gesamten Vitamin D-Gehalt des Plasmas nur ca. 16% (HADDAD and HAHN, 1973). Heute wird in verstärktem Maße synthetisch hergestelltes Vitamin D_3 eingesetzt.

Chemisch unterscheidet sich Vitamin D_2 von Vitamin D_3 (Cholecalciferol) durch eine zusätzliche Methylgruppe am C-24-Atom und durch das Vorhandensein einer Doppelbindung zwischen C-22 und C-23.

Frühere Studien mit Vitamin D_2 und D_3 deuten an, daß beide Prohormone gleiche Wirksamkeit bei Säugetieren aufweisen (NORMAN, 1979b); lediglich bei Neuweltaffen stellten HUNT et

al. (1967) eine geringere biologische Aktivität von Vitamin D_2 fest. Dagegen ist seit langem bekannt, daß Vitamin D_2 bei Vögeln weit weniger antirachitische Aktivität besitzt als Vitamin D_3 (STEENBOCK et al., 1932). Es wird auch bei Vögeln viel schneller aus dem Plasma eliminiert als bei Ratten (IMRIE et al., 1967).

HORST et al. (1982) repletierten rachitische Hühnerküken oral mit gleichen Mengen Vitamin D_2 und D_3 und führten 24 Stunden nach der letzten Verabreichung Konzentrationsmessungen im Plasma durch. Sie fanden, wie erwartet, einen wesentlich höheren Wert für Vitamin D_3 als für D_2 , aber das Verhältnis der Plasmakonzentrationen von Vitamin D_3 zu Vitamin D_2 und von $25(OH)D_3$ zu $25(OH)D_2$ änderte sich nur wenig. Deshalb nahmen sie an, daß die Diskriminierung gegenüber Vitamin D_2 vor der Umwandlung zu $25(OH)D_2$ stattfindet und durch Malabsorption beziehungsweise schnellere Ausscheidung bedingt sein könnte. Untersuchungen an Ratte und Schwein, die in derselben Studie durchgeführt wurden, zeigten beim Schwein ebenfalls eine Diskriminierung gegenüber Vitamin D_2 , hier jedoch auf der Stufe der 25-Hydroxylierung. Erstaunlich war das Ergebnis bei der Ratte. Hier wurde eine höhere $25(OH)D_2$ - als $25(OH)D_3$ -Konzentration festgestellt, was für eine Bevorzugung von Vitamin D_2 bei dieser Tierart sprechen würde.

Einen großen Fortschritt in der Aufklärung des Vitamin D_2 -Metabolismus brachte die Synthese und der Einsatz von radioaktiv markiertem Vitamin D_2 . Es wurde herausgefunden, daß Vitamin D_2 , entsprechend Vitamin D_3 , im Organismus zu polareren Metaboliten umgewandelt wird. So konnten SUDA et al. (1969) $25(OH)D_2$ aus dem Plasma von Ratten isolieren, und DRESCHER et al. (1969) demonstrierten die Bildung dieses Metaboliten auch beim Huhn. Dabei zeigte sich, daß beim Huhn die Umwandlungsraten von Vitamin D_2 zu $25(OH)D_2$ und von

Vitamin D_3 zu $25(OH)D_3$ etwa gleich groß sind. Während jedoch bei Vögeln ein deutlicher Unterschied zwischen der antirachitischen Wirkung von $25(OH)D_2$ und $25(OH)D_3$ besteht, besitzen beide bei der Ratte identische biologische Wirksamkeit (SUDA et al., 1970).

JONES et al. (1975) inkubierten radioaktiv markiertes Vitamin D_2 mit Nierenhomogenaten von rachitischen Küken und isolierten anschließend einen Metaboliten, der als $1,25(OH)_2D_2$ identifiziert wurde. In dieser Studie demonstrierten sie auch, daß bei der Ratte $1,25(OH)_2D_2$ die gleiche antirachitische Aktivität wie $1,25(OH)_2D_3$ aufweist. Weitere in vitro Untersuchungen mit aus Nierenmitochondrien gewonnenem $1,25(OH)_2D_2$ zeigten dagegen beim Huhn bezüglich des Calciumtransportes nur 1/5 bis 1/10 der Wirksamkeit von $1,25(OH)_2D_3$ (JONES et al., 1976a). Dies konnten auch RAMBECK et al. (1984) in ihren Untersuchungen mit rachitischen Hühnerküken bestätigen. Sie stellten nämlich fest, daß $1,25(OH)_2D_2$ in der Bildung von CaBP 7 bis 8 mal weniger wirksam ist als $1,25(OH)_2D_3$, während Vitamin D_2 gegenüber D_3 eine 80 mal geringere Wirkung besitzt. Sie schlossen daraus, daß mindestens zwei Diskriminierungspunkte gegenüber Vitamin D_2 beim Huhn bestehen müssen, der eine vor der Metabolisierung von Vitamin D_2 und der andere nach der Umwandlung zu $1,25(OH)_2D_2$.

Die Ursache für die Diskriminierung von Vögeln gegenüber Vitamin D_2 ist noch nicht geklärt. JONES et al. (1976b) stellten fest, daß beim Huhn in Leber und Niere die nötigen Enzyme für die Synthese von $25(OH)D_2$, $1,25(OH)_2D_2$ und $24,25(OH)_2D_2$ vorhanden sind. Die Umwandlung von Vitamin D_3 und Vitamin D_2 zu dessen Metaboliten geschieht bei gleicher Substratmenge zu gleichen Anteilen. Aufgrund der ähnlichen Enzymkinetik und der Lokalisation der Enzyme in Leber und Niere kamen sie deshalb zu dem Schluß, daß Vitamin D_2 und

D_3 durch dasselbe Enzymsystem metabolisiert werden. Eine mögliche Ursache für die geringere Wirksamkeit von Vitamin D_2 beim Vogel könnte eine geringere Bindungsstärke der D_2 -Metabolite an Rezeptoren der Zielorgane darstellen. KREAM et al. (1977) konnten jedoch in einem in vitro Versuch beim Huhn keine unterschiedliche Bindungsaffinität von $1,25(OH)_2D_2$ und $1,25(OH)_2D_3$ an dem intestinalen Cytosolrezeptor feststellen.

Die verschieden starke Bindung von Vitamin D_2 - und D_3 -Metaboliten an das D-bindende Transportprotein (DBP) könnte ebenfalls ein limitierender Faktor der Vitamin D_2 -Wirkung beim Vogel sein. Während $25(OH)D_2$ und $25(OH)D_3$ bei der Ratte mit gleicher Stärke an das DBP gebunden wurden, war beim Huhn die 15-fache Menge von $25(OH)D_2$ nötig, um 50% radioaktiv markiertes $25(OH)D_3$ aus der Bindung zu verdrängen (BELSEY et al., 1974).

Einen weiteren Metaboliten des Vitamin D_2 -Stoffwechsels stellt $24,25(OH)_2D_2$ dar. Dieser konnte aus Niere und Plasma von Ratten isoliert werden (JONES et al., 1979). Über seine biologische Wirkung ist jedoch wenig bekannt.

In mit $1,25(OH)_2D_2$ inkubierten, bovinen Nierenhomogenaten und in mit $24,25(OH)_2D_2$ inkubierten Nierenhomogenaten von rachitischen Küken wurde ein neuer Vitamin D_2 -Metabolit, das $1,24,25(OH)_3D_2$, entdeckt. Dieser Metabolit zeigte gleiche Affinität zum intestinalen Cytosolrezeptor für $1,25(OH)_2D_3$ bei Rind und Huhn, wurde jedoch bei der Ratte mit 2 mal größerer Affinität als $1,24,25(OH)_3D_3$ an den Rezeptor gebunden. In Bezug auf den intestinalen Calciumtransport erwies sich $1,24,25(OH)_3D_2$ weit weniger aktiv als $1,25(OH)_2D_3$, $1,25(OH)_2D_2$ sowie $1,24,25(OH)_2D_3$, war jedoch fast völlig unwirksam in der Calciumfreisetzung aus den Knochen (HORST et al., 1986). Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß die Tendenz von Vitamin D_2 -Metaboliten, Hypercalcämie zu erzeugen, wesentlich geringer als von Vitamin D_3 -Metaboliten

ist. Außerdem scheint die C-24-Hydroxylierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ einen wichtigen Inaktivierungsschritt darzustellen.

Neuere Untersuchungen, den Metabolismus von Vitamin D_2 betreffend, sprechen der C-26- und der C-28-Hydroxylierung von Vitamin D_2 -Metaboliten eine wichtige Rolle zu (REDDY and TSERNG, 1986a; REDDY et al., 1986b). Die physiologische Bedeutung dieser Hydroxylierungsprodukte ist unbekannt; es dürfte sich um Exkretionsprodukte von Vitamin D_2 handeln.

Die Metabolisierung von Vitamin D_3 und D_2 soll über die gleichen Zwischenstufen verlaufen, jedoch wird $25(\text{OH})\text{D}-23,26$ -Lacton möglicherweise nur von Vitamin D_3 gebildet (HORST et al., 1981). Den Hauptausscheidungsweg für Vitamin D_2 -Metabolite stellt, wie für Vitamin D_3 , die Galle dar. Bei den Ausscheidungsprodukten handelt es sich um polare Metaboliten von Vitamin D_3 und D_2 , die zum Teil Konjugate der intakten Sterole sind (KUMAR et al., 1981; Le VAN et al., 1981).

So konnte $25(\text{OH})\text{D}_2$ -25-Glucuronid aus der Galle von Vögeln isoliert werden (Le VAN et al., 1981). HIGAKI et al. (1965) fanden Vitamin D_2 -Sulfat im Kaninchenurin und bewiesen die Fähigkeit von Rattenleberhomogenaten, diesen Metaboliten zu bilden.

KUMAR et al. (1982) synthetisierten Vitamin D_2 -3 β -Glucosiduronat und Vitamin D_2 -3 β -Sulfat und untersuchten diese Metaboliten auf ihre biologische Wirksamkeit bei Vitamin D-depletierten Ratten. Nach Verabreichung der Substanzen wurde die Calciumfreisetzung aus den Knochen sowie der intestinale Calciumtransport gemessen. Dabei zeigte sich intravenös appliziertes Glucosiduronat sowohl am Knochen als auch am Darm wirksam, war jedoch nur 1/10 so aktiv wie äquimolare Dosen von Vitamin D_2 . Die Untersucher nahmen deshalb an, daß Hydrolyse eine Voraussetzung für das Erreichen der biologischen Wirksamkeit darstellt. Vitamin D_2 -3 β -Sulfat erwies sich in beiden Testsystemen als biologisch inaktiv.

Ein anderer synthetisch hergestellter Vitamin D_2 -Metabolit, der in jüngster Zeit sehr viel Bedeutung gewonnen hat, ist das $1\alpha(OH)D_2$. REEVE et al. (1978) fanden bei Untersuchungen mit Vitamin D-mangelernährten Ratten gleiche Wirksamkeit von $1\alpha(OH)D_2$ und $25(OH)D_3$ in der Stimulation des intestinalen Calciumtransportes, $1\alpha(OH)D_2$ war jedoch bezüglich der Calciumfreisetzung aus den Knochen nur 1/4 so aktiv wie $25(OH)D_3$. Die geringere Wirksamkeit von $1\alpha(OH)D_2$ auf die Knochencalciummobilisierung konnte von SJÖDEN et al. (1985) nicht bestätigt werden. Sie fanden bei der Ratte gleiche Aktivitäten für $1\alpha(OH)D_2$ und $1\alpha(OH)D_3$ in Bezug auf alle wichtigen Vitamin D-Wirkungen. Durch LD_{50} -Studien konnten sie jedoch nachweisen, daß $1\alpha(OH)D_2$ 10 mal weniger toxisch wirkt als $1\alpha(OH)D_3$. Die Ursache für die geringere Toxizität ist unbekannt.

Wenn sich der geringere toxische Effekt von Vitamin D_2 -Metaboliten auch beim Menschen bestätigen ließe, könnte in Zukunft der therapeutische Einsatz von Vitamin D_2 -Metabolitpräparaten in der Humanmedizin an Bedeutung gewinnen.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In einer aus sechs Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe am Hühnerküken sollte die Calciummobilisierung aus den Knochen unter dem Einfluß verschiedener natürlicher und synthetischer Vitamin D-Metabolite untersucht werden. Dabei wurden die Vitamin D-Metabolite einzeln oder in Kombinationen verabreicht. Bei den Kombinationen wurden gleichzeitig zwei beziehungsweise drei verschiedene Vitamin D-Metabolite nebeneinander eingesetzt (Zweier- und Dreierkombinationen). Die Aktivität der einzelnen Vitamin D-Metabolite und deren Kombinationen wurde über die Erhöhung des Serumcalciumspiegels gegenüber einer Vitamin D-freien Gruppe (=negative Kontrollgruppe) bestimmt.

3.1. Tiermaterial

In allen sechs Versuchen wurden männliche Mastküken (Lohmann 975) der Brüterei Süd als Versuchstiere verwendet. Durch ihr schnelles Wachstum und dem damit verbundenen hohen Calciumbedarf ist diese Mastrasse besonders für Vitamin D-Mangelversuche geeignet. Bei Vitamin D-Depletion zeigen sich bereits nach 5 - 7 Tagen erste rachitische Symptome. Auch reicht bei dieser Rasse eine 3-tägige calciumarme Diät in der Versuchsperiode aus, um eine Calciumabsorption aus dem Darm fast gänzlich auszuschließen.

3.2. Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden als Eintagsküken von der Brüterei bezogen und während der gesamten Versuchsdauer in einem fensterlosen Raum mit etwa 28 m² Grundfläche eingestallt. Die Tiere wurden gleichmäßig auf Kunststoffkäfige mit etwa

0,5 m² Grundfläche und 30 cm Höhe verteilt. Die Käfige standen an den beiden Längsseiten des Stalles auf 70 cm hohen Holzgestellen, um annähernd gleiche Licht- und Temperaturverhältnisse zu schaffen. Die Küken saßen auf Drahtgittern, unter denen sich eine Torfmulleinstreu als feuchtigkeits- und geruchsbindende Schicht befand. Die Beleuchtung erfolgte über 24 Stunden mittels 5 Leuchtstoffröhren mit 40 Watt Leistung von der Decke aus. Drei Heizkörper sorgten für eine gleichmäßige Verteilung der Raumtemperatur, die in der ersten Woche 32°C betrug und bis Versuchsende auf 27°C abgesenkt wurde. Das Futter in der Vor- und Versuchsperiode wurde in 7x7x35 cm großen Kunststofftrögen ad libitum angeboten. Die Wasserversorgung war mittels automatischer Nippeltränken gewährleistet, die eine gleichmäßige Versorgung mit frischem Wasser ermöglichten.

3.3. Versuchsdurchführung

Die Versuche setzten sich aus zwei Abschnitten zusammen: Einer 16-tägigen Vitamin D-Depletion in der Vorperiode, folgte eine 3-tägige Versuchsperiode, in der die Tiere eine Vitamin D-freie- und calciumarme-Diät erhielten. Am Ende dieser Versuchsperiode wurden die Vitamin D-Metabolite verabreicht und 12 Stunden später die Küken getötet, wobei das Blut für die Serumcalciumbestimmung gewonnen wurde.

Vorperiode

Während der Vorperiode erhielten die Tiere ein Vitamin D-freies Alleinfutter (Tab.2) mit einem normalen Calcium- (0,99%) und Phosphorgehalt (0,51%). Bereits nach einer Woche zeigten sich bei den Küken erste rachitische Symptome, wie unsicherer schwankender Gang, vermehrtes Sitzen mit nach vorne gestreckten Ständern und beginnende Zehenverkrümmungen, die sich bis zum Versuchsende drastisch verstärkten.

Versuchsperiode

Im Laufe der 3-tägigen Versuchsperiode erhielten die Tiere eine Diät, die etwa 0,2% Calcium und 0,51% Phosphor enthielt (Tab.3). Die Küken hatten so am Ende dieser Versuchsphase einen sehr niedrigen Serumcalciumspiegel, da weder Calcium-Reserven aus dem Darm noch Vitamin D zur Verfügung standen. Innerhalb der calciumarmen Fütterungsperiode wurden die Tiere mit Flügelmarken gekennzeichnet, gewogen, und in homogene Gruppen eingeteilt. Gegen Ende der Versuchsperiode wurden den Küken die Vitamin Metabolite intravenös verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich das Lösungsmittel appliziert. Dabei ging man folgendermaßen vor: Es wurde ausschließlich in die rechte Vena jugularis injiziert, da diese beim Huhn stärker ausgeprägt ist als die linke. Eine Hilfsperson fixierte das Küken so, daß die rechte Halsseite freilag. Der Kopf des Tieres wurde nun von der Person, die die Injektion durchführte, zwischen Zeige- und Mittelfinger der linken Hand genommen und mit dem Daumen die Vene gestaut. Das Injektionsvolumen betrug 0,2 ml pro Tier und wurde, nachdem der richtige Sitz der Kanüle durch Aspiration festgestellt worden war, innerhalb 3-4 Sekunden gespritzt. Der Vorgang mußte so schonend wie möglich erfolgen, da die Tiere sehr stressanfällig waren. Nach 12 Stunden wurden die Küken getötet und dabei das Blut für die Serumcalciumbestimmung gewonnen.

3.4. Verabreichte Vitamin D-Metabolite

Als Lösungsmittel diente in allen Versuchen ein Propandiol-Äthanol-Gemisch im Verhältnis 9:1.

An Metaboliten wurden uns freundlicherweise von Dr.W.Meier, F. Hoffmann-La Roche AG Basel, zur Verfügung gestellt:

1,25-Dihydroxycholecalciferol	1,25(OH) ₂ D ₃
24R,25-Dihydroxycholecalciferol	24,25(OH) ₂ D ₃

1,24R,25-Trihydroxycholecalciferol	1,24,25(OH) ₃ D ₃
1,25S,26-Trihydroxycholecalciferol	1,25,26(OH) ₃ D ₃
1α-Hydroxycholecalciferol	1α(OH)D ₃
1,25-Dihydroxyergocalciferol	1,25(OH) ₂ D ₂

Es wurden zum Teil Zweier- und Dreierkombinationen dieser Metabolite eingesetzt.

3.5. Probenahme und Bestimmungsmethoden

Gewichtsbestimmung

Einen Tag vor Versuchsende wurden die Tiere gewogen und in Gewichtsklassen eingeteilt. Extremgewichte wurden aussortiert. Die mittleren Gewichtsklassen wurden möglichst gleichmäßig auf die Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Verteilung der Gruppen auf die Käfige erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Serumgewinnung

Zur Blutentnahme wurde den Tieren die rechtsseitige Jugularvene mittels Skalpellschnitt eröffnet, und das Blut in Serumröhrchen, die gerinnungsförderndes Granulat enthielten, aufgefangen. Die Proben wurden 1 1/2 bis 2 Stunden stehen gelassen und anschließend 10 Minuten bei 1200 x g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde nun mittels Pasteurpipetten abpipettiert und die Serumproben bis zur Calciumbestimmung bei -20°C tiefgefroren.

Serumcalciumbestimmung

Die Einzelproben wurden mit 5%iger Lithiumchloridlösung im Verhältnis 1:20 durch einen Dual Diluter (F. Scientific Instr. Service England) verdünnt und anschließend die Serumcalciummessung mit einem Eppendorf Flammenphotometer durchgeführt.

Tabelle 2

Vitamin D-freies Alleinfutter der Vorperiode
(0,99% Ca, 0,51% P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	55,00
Native Maisstärke	31,26
Sojaöl, raff.	10,00
$\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,08
CaCO_3	1,50
NaCl	0,40
DL-Methionin	0,26
Vitamin- und Spurenelementvormischung ⁺	0,50
Gesamt	100,00

+ siehe Tabelle 4

Tabelle 3

Versuchsperiodenfutter

(0,2% Ca, 0,51% P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	55,00
Native Maisstärke	32,72
Sojaöl, raff.	10,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1,00
KCl	0,52
DL-Methionin	0,26
Vitamin- und Spurenelementvormischung ⁺	0,50
Gesamt	100,00

+ siehe Tabelle 4

Tabelle 4

Vitamin- und Spurenelementvormischung

Menge, für den Zusatz zu einem kg Futter,
bei einem Anteil von 0,5% an der Diät

Komponenten	
Retinol	1,50 mg
Thiamin	2,00 mg
Nicotinsäure	40,00 mg
Ca-Pantothenat	12,00 mg
Riboflavin	4,00 mg
Pyridoxin	2,00 mg
Cyanocobalamin	0,02 mg
α -DL-Tocopherolacetat	120,00 mg
Vitamin K ₃	1,00 mg
Cholinchlorid	1500,00 mg
Fe-Fumarat	100,00 mg
MnSO ₄ xH ₂ O	200,00 mg
ZnSO ₄ x7H ₂ O	200,00 mg
Sojafleinmehl	ad 5000,00 mg

4. VERSUCHSBESCHREIBUNG UND ERGEBNISSE

In vorangehenden Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß durch die kombinierte Verabreichung verschiedener Vitamin D-Metabolite am Darm eine gegenseitige Wirkungssverstärkung erfolgt (RAMBECK and ZUCKER, 1985b), während man bei Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Knochen keinen wirkungsverstärkenden sondern einen -abschwächenden Einfluß beobachten konnte (PFLÜGER, 1986). Dabei hatte der Einsatz dieser Metabolite im Verhältnis 1:10 die geringste demineralisierende Wirkung.

4.1. Versuch I

In allen Versuchen wurde die Knochendemineralisierung durch die Gabe verschiedener Vitamin D-Metabolite über die Erhöhung des Serumcalciumspiegels bestimmt.

Im ersten Versuch wurden die Verbindungen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert. Dabei sollte sich zeigen, inwieweit der von PFLÜGER (1986) beschriebene wirkungsabschwächende Effekt von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bestätigt werden konnte, und ob eine Kombination aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ebenfalls eine Wirkungsabschwächung beziehungsweise eine Potenzierung zur Folge hat. Es wurde auch eine Dreierkombination, bestehend aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, eingesetzt, sowie verschiedene Dosierungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ getestet, um die Dosiswirkungsbeziehung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Serumcalciumerhöhung festzustellen. Außerdem kamen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in je zwei verschiedenen Dosierungen zum Einsatz.

Neben einer negativen Kontrollgruppe, die als Nullwert diente und der lediglich das Lösungsmittel appliziert wurde, wurden folgende Metabolite eingesetzt:

1,25(OH) ₂ D ₃	:	0,068/ug
		0,14/ug
		0,27/ug
		0,54/ug
		1,08/ug
		2,16/ug
1,24,25(OH) ₃ D ₃	:	0,14/ug
		0,28/ug
24,25(OH) ₂ D ₃	:	0,27/ug
		0,54/ug

Insgesamt wurden 7 verschiedene Kombinationsdosierungen und 5 verschiedene Verhältnisse getestet. Die untersuchten Verhältnisse und Dosierungen der eingesetzten Metabolitkombinationen von allen Versuchen sind aus den Tabellen 5 und 6 ersichtlich. In diesem Versuch wurde 1,25(OH)₂D₃ mit 1,24,25(OH)₃D₃ im molaren Verhältnis von 1:1 und 1:2 beziehungsweise 2:1 kombiniert. Mit 24,25(OH)₂D₃ betrugen die Kombinationsverhältnisse 1:2 beziehungsweise 1:4. Die Dreierkombination bestand aus 1,25(OH)₂D₃, 1,24,25(OH)₃D₃ und 24,25(OH)₂D₃ und wurde im Verhältnis 1:2:4 appliziert.

Ergebnis:

Serumcalcium (Tab. 8)

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß der Serumcalciumgehalt als Maß für die Knochendemineralisierung bei logarithmisch zunehmender Konzentration von 1,25(OH)₂D₃ linear ansteigt (Tab. 7). Der größte Anstieg bei den Zweierkombinationen zeigte sich bei der Kombination von 0,27/ug 1,25(OH)₂D₃ mit 0,28/ug 1,24,25(OH)₃D₃, der Serumcalciumgehalt lag deutlich über dem, der durch die alleinige Gabe von 1,25(OH)₂D₃ erreicht werden konnte (p 0,025). 1,24,25(OH)₃D₃ allein verabreicht zeigte bei der höheren Dosierung (0,28/ug) keinerlei Effekt, der Wert lag sogar unter dem der negativen

Kontrollgruppe. Wurden jedoch 0,28/ μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$ mit 0,27/ μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ kombiniert, zeigte sich ein relativ hoher Serumcalciumspiegel. Bei Kombination von 1,25(OH) $_3$ D $_3$ mit 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$ im Verhältnis 1:2 (0,14/ μ g + 0,28/ μ g) jedoch war ein sehr niedriger Serumcalciumwert zu sehen. 24,25(OH) $_2$ D $_3$, in Dosierungen von 0,27/ μ g und 0,54/ μ g eingesetzt, vermochte den Serumcalciumgehalt gegenüber der negativen Kontrollgruppe zwar dosisabhängig zu steigern, war aber weit weniger aktiv als 1,25(OH) $_2$ D $_3$. Das Verhältnis der biologischen Aktivität von 1,25(OH) $_2$ D $_3$ zu 24,25(OH) $_2$ D $_3$ betrug etwa 4:1. Die Kombination von 0,14/ μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ mit 0,27/ μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$ erbrachte keine Steigerung des Calciumwertes gegenüber der alleinigen Verabreichung von 0,14/ μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$, während die Kombination mit 0,54/ μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$ nur geringfügig darüber lag. Die Dreierkombination aus 0,068/ μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$, 0,14/ μ g 1,24,25(OH) $_3$ D $_3$ und 0,27/ μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$ lag zwar insgesamt gesehen sehr niedrig, wobei aber zu beachten ist, daß 0,068/ μ g 1,25(OH) $_2$ D $_3$ und 0,27/ μ g 24,25(OH) $_2$ D $_3$, allein verabreicht, Serumcalciumwerte erzielten, die im Bereich der negativen Kontrollgruppe lagen.

Tabelle 5

Versuche I bis VI

Knochencalciummobilisierung durch die kombinierte Verabreichung
von zwei Vitamin D-Metaboliten

getestete Verhältnisse	getestete Dosierungen (/ug/Tier)
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3:1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3+1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$
1 : 1	0,14 + 0,14
1 : 1	0,27 + 0,28
1*: 1	0,13* + 0,14
1 : 2	0,14 + 0,28
2 : 1	0,27 + 0,14
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3:24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3+24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
1 : 2	0,14 + 0,27
1 : 4	0,14 + 0,54
1*: 4	0,13* + 0,54
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3:1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$	$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3+1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$
1 : 2	0,14 + 0,28

* anstelle von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, das synthetische Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, verwendet

Tabelle 6

Versuche I bis VI

Knochencalciummobilisierung durch die kombinierte Verabreichung
von drei Vitamin D-Metaboliten

getestete Verhältnisse	getestete Dosierungen (/ug/Tier)
1,25(OH) ₂ D ₃ :1,24,25(OH) ₃ D ₃ :24,25(OH) ₂ D ₃	1,25(OH) ₂ D ₃ +1,24,25(OH) ₃ D ₃ +24,25(OH) ₂ D ₃
1 : 1 : 2	0,14 + 0,14 + 0,27
1 : 1 : 4	0,14 + 0,14 + 0,54
1 : 2 : 2	0,14 + 0,28 + 0,27
1 : 2 : 4	0,068 + 0,14 + 0,27
1 : 2 : 4	0,14 + 0,28 + 0,54
2*: 1 : 2	0,27* + 0,14 + 0,27

* anstelle von 1,25(OH)₂D₃ wurde 1,25(OH)₂D₂ verwendet

Tabelle 7

Versuch I

Einfluß der 1,25(OH)₂D₃-Dosis auf die
Serumcalciumerhöhung⁺

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (μ g / Tier)	Serumcalcium (mg / 100 ml) 12 Stunden nach i.v. Applikation	
	$\bar{x}$	$\pm s$
— (neg. Kontrolle)	4,71	0,84
0,068/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	4,84	0,42
0,14/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	5,30	0,82
0,27/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	5,36	0,79
0,54/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	5,42	1,13
1,08/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	6,00	0,65
2,16/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	6,16	0,96

+ gemessen in mg / 100 ml

Tabelle 8

Versuch I

Knochencalciummobilisierung durch kombinierte Verabreichung
von 1,25(OH)₂D₃, 1,24,25(OH)₃D₃ und 24,25(OH)₂D₃

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (/ug / Tier)	Serumcalcium ⁺ (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
— (neg. Kontrolle)	4,71	0,84
0,068/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	4,84	0,42
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	5,30	0,82
0,27/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	5,36	0,79
0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,21	1,40
0,28/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	4,60	0,50
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,57	1,19
0,14/ug 1,25(OH) ₃ D ₃ +0,28/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,07	1,00
0,27/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,35	0,77
0,27/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,28/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	6,13	0,83
0,27/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	4,81	1,07
0,54 24,25(OH) ₂ D ₃	5,22	0,86
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,27/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,21	0,39
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,51	1,03
Dreierkombination:		
0,068/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃ +0,27/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,40	0,89

+ gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

4.2. Versuch II

Nachdem im ersten Versuch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Zweierkombinationen beziehungsweise einer Dreierkombination verabreicht worden war, sollten die erhaltenen Ergebnisse im zweiten Versuch am gleichen Versuchsmodell nochmals überprüft werden. Außerdem wurde $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ allein und in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eingesetzt, um die Wirkung dieses Metaboliten auf die Knochencalciummobilisierung festzustellen. Da sich die im ersten Versuch für die Dreierkombination gewählte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis als zu niedrig erwiesen hatte, wurde nun eine etwas höhere $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosierung für die Kombinationen verwendet.

Folgende Metabolite wurden verwendet:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,14/ug
		0,27/ug
		0,54/ug
$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	:	0,14/ug
		0,28/ug
$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,27/ug
$1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$	:	0,28/ug

Eine negative Kontrollgruppe diente als Nullwert. Drei Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zwei mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, eine mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und eine mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ wurden gebildet. Bei der kombinierten Verabreichung wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 (0,14/ug + 0,14/ug) beziehungsweise 1:2 (0,14/ug + 0,28/ug) getestet. Mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kam $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:2 (0,14/ug + 0,27/ug) und mit $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ ebenfalls im Verhältnis 1:2 (0,14/ug + 0,28/ug) zum Einsatz. Die zwei Dreierkombinationen bestanden aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und wurden im Verhältnis 1:1:2 beziehungsweise 1:2:2 untersucht.

Ergebnis:

Serumcalcium (Tab. 9)

Auch hier ist eine lineare Erhöhung des Serumcalciumspiegels bei steigender $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosierung festzustellen. Die im ersten Versuch fehlende Wirkung von $0,28/\mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ konnte nicht bestätigt werden. Es zeigt sich eine dosisabhängige Erhöhung des Serumcalciums gegenüber der negativen Kontrollgruppe. Der Effekt von $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ beträgt 50% von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei den Zweierkombinationen zeigte die Kombination von $0,14/\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $0,27/\mu\text{g } 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ den geringsten demineralisierenden Effekt, während bei beiden Kombinationen mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ der Serumcalciumspiegel deutlich höher liegt. Bei der Gabe von $0,28/\mu\text{g } 1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ zusammen mit $0,14/\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird ein Serumcalciumgehalt erreicht, der einen signifikanten Unterschied zur $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppe aufweist ($p < 0,025$). Die Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1:2 liegt mit $5,39 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ äußerst niedrig, während die Kombination im Verhältnis 1:2:2 nur um 2,5% darüber liegt, aber einen signifikanten Unterschied zur $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppe aufweist ($p < 0,05$).

Tabelle 9

Versuch II

Knochencalciummobilisierung durch kombinierte Verabreichung von
 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (μg / Tier)	Serumcalcium ⁺ (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
— (neg. Kontrolle)	4,54	0,62
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,07	0,55
0,27/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,68	0,74
0,54/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,83	0,76
0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,06	0,65
0,28/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,72	0,86
0,27/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,38	1,03
0,28/ μg $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,04	0,69
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,68	0,44
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,28/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,53	0,66
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,27/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,21	0,56
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,28/ μg $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,76	0,61
Dreierkombinationen:		
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ + 0,27/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,39	0,63
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,28/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ + 0,27/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,52	0,58

+ gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

4.3. Versuch III

Im dritten Versuch wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wiederum mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kombiniert. Dabei wurde $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in höherer Dosierung als im zweiten Versuch eingesetzt. Zusätzlich sollte $1(\text{OH})\text{D}_3$, das synthetische Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, auf seine Knochenwirkung untersucht werden.

Die Metaboliten wurden in folgenden Mengen eingesetzt:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,14/ug 0,27/ug 0,54/ug
$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	:	0,14/ug 0,28/ug
$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,54/ug
$1(\text{OH})\text{D}_3$	..	0,13/ug

Zusammen mit einer negativen Kontrollgruppe kamen drei Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zwei mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und je eine mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $1(\text{OH})\text{D}_3$ zum Einsatz. Kombiniert wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 (0,14/ug + 0,14/ug) und mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:4 (0,14/ug + 0,54/ug). Die Dreierkombinationen, bestehend aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wurden im Verhältnis 1:1:4 (0,14/ug + 0,14/ug + 0,54/ug) beziehungsweise 1:2:4 (0,14/ug + 0,28/ug + 0,54/ug) untersucht. $1(\text{OH})\text{D}_3$ wurde zusammen mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ beziehungsweise $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ appliziert und zwar im Verhältnis 1:1 beziehungsweise 1:4.

Ergebnis:

Serumcalcium (Tab. 10)

$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, in beiden Dosierungen sowie $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermochten bei alleiniger Gabe keine Erhöhung des Serumcal-

ciumspiegels gegenüber der negativen Kontrollgruppe zu bewirken. Hingegen konnte, wie in den zwei vorangegangenen Versuchen, eine dosisabhängige Erhöhung des Serumcalciums durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesehen werden. Eine kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,14/\mu\text{g} + 0,54/\mu\text{g}$) vermochte den Calciumwert zwar gegenüber der alleinigen Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu steigern, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ($0,14/\mu\text{g} + 0,14/\mu\text{g}$) ergab einen Wert, der nicht sehr deutlich über dem der negativen Kontrolle lag. Bei den Kombinationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,14/\mu\text{g} + 0,14/\mu\text{g} + 0,54/\mu\text{g}$ und $0,14/\mu\text{g} + 0,28/\mu\text{g} + 0,54/\mu\text{g}$) lag die Kombination mit $0,14/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ deutlich über der mit $0,28/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und wies einen signifikanten Unterschied gegenüber der alleinigen Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf ($p \leq 0,05$). Der Serumcalciumspiegel der $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ -Gruppe zeigte keine nennenswerte Steigerung gegenüber der negativen Kontrollgruppe. Die Wirksamkeit von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ betrug 40% von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Der Wert bei der Kombination von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 lag höher als bei der Kombination mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:4 und es zeigte sich in dieser Gruppe auch ein signifikanter Unterschied zur alleinigen Verabreichung von $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ($p \leq 0,05$).

Tabelle 10

Versuch III

Knochencalciummobilisierung durch kombinierte Verabreichung von
 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (μg / Tier)	Serumcalcium ⁺ (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
— (neg. Kontrolle)	5,05	1,16
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,32	0,59
0,27/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,69	0,24
0,54/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	6,00	0,42
0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,00	0,60
0,28/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,08	0,39
0,54/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,00	0,55
0,13/ μg $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$	5,13	0,42
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,16	0,66
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,54/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,58	0,90
0,13/ μg $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ + 0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	5,66	0,55
0,13/ μg $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ + 0,54/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,48	0,61
Dreierkombinationen:		
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,14/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ + 0,54/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,78	0,62
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ + 0,28/ μg $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ + 0,54/ μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,45	0,56

+ gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

4.4. Versuch IV

In diesem Versuch wurden bereits getestete Kombinationen nochmals untersucht und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erneut in zwei Dosierungen verabreicht. Nachdem sich angedeutet hatte, daß die Kombination von verschiedenen Metaboliten keine potenzierende Wirkung auf die Calciumfreisetzung aus dem Knochen ausübt, sollten jetzt vor allem Dreierkombinationen zum Einsatz kommen. Dabei wurde erstmals in dieser Versuchsreihe die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis für eine Dreierkombination höher gewählt.

Eingesetzte Metabolitmengen:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,14/ug
		0,27/ug
		0,54/ug
		1,08/ug
$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	:	0,14/ug
$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,27/ug
		0,54/ug

12 verschiedene Gruppen wurden gebildet. Außer der negativen Kontrollgruppe, vier $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen, einer $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Gruppe und zwei $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen wurden vier Kombinationen eingesetzt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde nochmals mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 untersucht und zusammen mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in drei Dreierkombinationsgruppen getestet. Dabei betrugen die Kombinationsverhältnisse 1:1:2, 1:1:4 beziehungsweise 2:1:2.

Ergebnis:

Serumcalcium (Tab. 11)

Bei allen Gruppen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war ein steter, dosisabhängiger Anstieg des Serumcalciumwertes zu erkennen.

Auch die $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen zeigten eine dosisabhängige

Wirkung, wobei die Gruppe mit 0,54,ug weit höher lag als in allen vorangegangenen Untersuchungen. Die Kombination aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (0,14,ug + 0,14,ug) brachte eine Steigerung des Serumcalciums gegenüber der alleinigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gabe. Bei den Dreierkombinationen zeigte die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1:2 (0,14,ug + 0,14,ug + 0,27,ug) den geringsten Anstieg des Calciumgehaltes und somit den geringsten demineralisierenden Effekt. Die Kombination der drei Metabolite im Verhältnis 2:1:2 (0,27,ug + 0,14,ug + 0,27,ug) zeigte zwar absolut gesehen den deutlichsten Serumcalciumanstieg, ist aber nicht signifikant unterschiedlich von der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppe. Verglichen mit der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ (0,14,ug + 0,14,ug) konnte das Hinzufügen von 0,54,ug $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu diesen beiden Metaboliten keine Erhöhung des Calciumwertes mehr bewirken. Bei allen Dreierkombinationen lagen die Serumcalciumgehalte unter dem additiv errechneten Wert.

Tabelle 11

Versuch IV

Knochencalciummobilisierung durch kombinierte Verabreichung
von 1,25(OH)₂D₃, 1,24,25(OH)₃D₃ und 24,25(OH)₂D₃

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 11 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (/ug / Tier)	Serumcalcium ⁺ (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
—(neg. Kontrolle)	4,84	0,50
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	5,30	0,72
0,27/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	5,68	0,73
0,54/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	5,95	0,49
1,08/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	6,16	0,47
0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,20	0,38
0,27/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,21	0,51
0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,86	0,82
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,78	0,58
Dreierkombinationen:		
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,54	0,42
+0,27/ug 24,25(OH) ₂ D ₃		
0,27/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,88	0,51
+0,27/ug 24,25(OH) ₂ D ₃		
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,74	0,83
+0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃		

+ gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

4.5. Versuch V

Da in allen bisher durchgeführten Versuchen nur Metabolite des Vitamin D_3 (Cholecalciferol) eingesetzt worden waren, sollte nun mit $1,25(OH)_2D_2$ zum ersten Mal in dieser Versuchsreihe ein Metabolit des Vitamin D_2 (Ergocalciferol) getestet werden. Bei früheren Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß $1,25(OH)_2D_2$ beim rachitischen Hühnerküken bezüglich der CaBP-Bildung und des Knochenaschegehaltes 7 bis 8 mal weniger wirksam ist als der entsprechende Vitamin D_3 -Metabolit (RAMBECK and ZUCKER, 1984). In diesem Versuch sollte nun speziell die Knochenwirkung von $1,25(OH)_2D_2$ am gleichen Versuchsmodell über die Erhöhung des Serumcalciumspiegels untersucht und mit $1,25(OH)_2D_3$ verglichen werden. Folgende Metabolitmengen wurden verwendet:

$1,25(OH)_2D_3$	:	0,14/ μ g
		0,27/ μ g
		0,54/ μ g
$1,25(OH)_2D_2$	:	0,14/ μ g
		0,27/ μ g
		0,54/ μ g
		1,08/ μ g
$1,24,25(OH)_3D_3$	:	0,14/ μ g
		0,28/ μ g
$24,25(OH)_2D_3$	:	0,54/ μ g

Insgesamt wurden 14 Gruppen untersucht. Neben einer negativen Kontrollgruppe kamen drei $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen, vier $1,25(OH)_2D_2$ -Gruppen, zwei $1,24,25(OH)_3D_3$ -Gruppen und eine $24,25(OH)_2D_3$ -Gruppe zum Einsatz. Eine Zweierkombination aus $1,25(OH)_2D_3$ und $24,25(OH)_2D_3$ (0,14/ μ g + 0,54/ μ g) wurde untersucht. Bei den zwei Gruppen mit $1,25(OH)_2D_3$, $1,24,25(OH)_3D_3$ und $24,25(OH)_2D_3$ wurden Kombinationsverhältnisse von 1:1:4 (0,14/ μ g + 0,14/ μ g + 0,54/ μ g) beziehungsweise 1:2:4 (0,14/ μ g + 0,28/ μ g + 0,54/ μ g) gewählt.

Ergebnis:

Serumcalcium (Tab. 14)

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steigerte den Serumcalciumspiegel wie in allen vorhergegangenen Versuchen in Abhängigkeit von der Dosis (Tab. 12). Auch bei ansteigender $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Menge erhöhte sich das Serumcalcium dosisabhängig, wobei die Gruppe mit $1,08/\mu\text{g}$ einen niedrigeren Wert als die Gruppe mit $0,54/\mu\text{g}$ erreichte (Tab. 13). $0,14/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zeigte keine Wirkung, der Wert lag unter dem der negativen Kontrollgruppe. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ erwies sich in diesem Versuch etwa $1/2$ bis $1/3$ so aktiv wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Die beiden $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Gruppen ($0,14/\mu\text{g}$ + $0,28/\mu\text{g}$) erbrachten keine Erhöhung des Serumcalciums gegenüber der negativen Kontrollgruppe. Bei der kombinierten Verabreichung zeigte sich bei Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($0,14/\mu\text{g}$ + $0,54/\mu\text{g}$) sowie bei der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis $1:1:4$ ($0,14/\mu\text{g}$ + $0,14/\mu\text{g}$ + $0,54/\mu\text{g}$) keine Steigerung des Calciumwertes im Vergleich zur alleinigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Verabreichung. Lediglich die Dreierkombination im Verhältnis $1:2:4$ ($0,14/\mu\text{g}$ + $0,28/\mu\text{g}$ + $0,54/\mu\text{g}$) lag deutlich über der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppe ($p < 0,05$).

Tabelle 12

Versuch V

Einfluß der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis auf die
Serumcalciumerhöhung⁺

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (/ug / Tier)	Serumcalcium* (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
—(neg. Kontrolle)	5,10	0,89
0,14/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,50	0,72
0,27/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,74	0,44
0,54/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	6,24	0,99

Tabelle 13

Versuch V

Einfluß der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Dosis auf die
Serumcalciumerhöhung⁺

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (/ug / Tier)	Serumcalcium* (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
—(neg. Kontrolle)	5,10	0,89
0,14/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	4,80	0,52
0,27/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	5,34	0,99
0,54/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	5,88	0,78
1,08/ug $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	5,64	0,83

+ gemessen in mg / 100 ml

* gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

Tabelle 14

Versuch V

Knochencalciummobilisierung durch kombinierte Verabreichung
von 1,25(OH)₂D₃, 1,24,25(OH)₃D₃ und 24,25(OH)₂D₃

Mittelwert + Standardabweichung, n = 10 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (/ug / Tier)	Serumcalcium ⁺ (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
—(neg. Kontrolle)	5,10	0,89
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃	5,50	0,72
0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	4,98	0,49
0,28/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,05	0,62
0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,40	0,64
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃	5,47	0,43
Dreierkombinationen:		
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,42	0,72
+0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃		
0,14/ug 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,28/ug 1,24,25(OH) ₃ D ₃	6,12	0,72
+0,54/ug 24,25(OH) ₂ D ₃		

+ gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

4.6. Versuch VI

Da sich im letzten Versuch gezeigt hatte, daß die biologische Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ um den Faktor 2 bis 3 geringer ist, sollte das erhaltene Ergebnis in diesem Versuch nochmals überprüft werden. Dabei wurde die Anfangsdosierung für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ mit $0,27/\mu\text{g}$ höher gewählt als im letzten Versuch.

Folgende Metaboliten wurden eingesetzt:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	:	0,14/ μg 0,27/ μg 0,54/ μg
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	:	0,27/ μg 0,54/ μg 1,08/ μg 2,16/ μg
$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$	:	0,14/ μg
$24,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	:	0,54/ μg

Die insgesamt 13 gebildeten Gruppen bestanden aus einer negativen Kontrollgruppe, drei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen, vier $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Gruppen, je einer $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ - und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppe und drei Kombinationsgruppen.

Kombiniert wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einmal mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 ($0,14/\mu\text{g} + 0,14/\mu\text{g}$) sowie mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1:4 ($0,14/\mu\text{g} + 0,14/\mu\text{g} + 0,54/\mu\text{g}$). Auch eine Dreierkombination aus $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 2:1:4 ($0,27/\mu\text{g} + 0,14/\mu\text{g} + 0,54/\mu\text{g}$) wurde untersucht.

Ergebnis:

Serumcalcium (Tab. 17)

Wie bei den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppen (Tab. 15) zeigte sich auch bei steigender $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Dosierung ein kontinuierli-

cher Anstieg des Serumcalciumspiegels (Tab. 16). Wie im vorhergehenden Versuch erwies sich $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ 2 bis 3 mal weniger wirksam als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei den Kombinationsgruppen zeigte die gemeinsame Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die geringste demineralisierende Wirkung. Die Dreierkombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1:4 (0,14/ μg + 0,14/ μg + 0,54/ μg) erbrachte keine Erhöhung des Serumcalciumwertes gegenüber der Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1 (0,14/ μg + 0,14/ μg). Alle Kombinationsgruppen wiesen keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ auf.

Tabelle 15

Versuch VI

Einfluß der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis auf die
Serumcalciumerhöhung⁺

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 11 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (μg / Tier)	Serumcalcium* (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
—(neg. Kontrolle)	5,06	0,96
0,14/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,49	0,78
0,27/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,60	0,56
0,54/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	6,00	0,97

Tabelle 16

Versuch VI

Einfluß der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Dosis auf die
Serumcalciumerhöhung⁺

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 11 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (μg / Tier)	Serumcalcium* (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
—(neg. Kontrolle)	5,06	0,96
0,27/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	5,21	0,74
0,54/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	5,60	0,73
1,08/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	5,77	0,60
2,16/ μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$	6,35	1,01

+ gemessen in mg / 100 ml

* gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

Tabelle 17

Versuch VI

Knochencalciummobilisierung durch kombinierte Verabreichung
von 1,25(OH)₂D₃ bzw. 1,25(OH)₂D₂, 1,24,25(OH)₃D₃
und 24,25(OH)₂D₃

Mittelwert $\pm$ Standardabweichung, n = 11 bis 12 pro Gruppe

verabreichte Metabolite (μ g / Tier)	Serumcalcium ⁺ (mg / 100 ml)	
	$\bar{x}$	$\pm s$
— (neg. Kontrolle)	5,06	0,96
0,14/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃	5,49	0,78
0,27/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₂	5,21	0,74
0,14/ μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,19	0,91
0,54/ μ g 24,25(OH) ₂ D ₃	5,29	0,92
0,14/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,75	0,63
Dreierkombinationen:		
0,14/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₃ +0,14/ μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,74	0,64
+0,54/ μ g 24,25(OH) ₂ D ₃		
0,27/ μ g 1,25(OH) ₂ D ₂ +0,14/ μ g 1,24,25(OH) ₃ D ₃	5,56	0,80
+0,54/ μ g 24,25(OH) ₂ D ₃		

+ gemessen 12 Stunden nach i.v. Gabe

5. DISKUSSION

5.1. Dosis-Wirkungsbeziehung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zur Serumcalciumerhöhung

Die Erhöhung des Serumcalciumspiegels nach Gabe von Vitamin D-Metaboliten bei Vitamin D-frei- und calciumfreiernährten Tieren wurde mehrmals beschrieben und dient als Maßstab für die Calciumfreisetzung aus den Knochen (WONG et al., 1972; BOYLE et al., 1973).

Um die Abhängigkeit der Serumcalciumerhöhung von der eingesetzten Metabolitmenge zu ermitteln, wurde die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einem Dosierungsbereich von $0,068/\mu\text{g}$ bis $2,16/\mu\text{g}$ untersucht. Dabei zeigte sich bei logarithmisch aufgetragener Metabolitmenge ein linearer Wirkungsanstieg mit zunehmender $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis (Abb.1). Diese lineare Dosis-Wirkungsbeziehung konnte für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in allen Versuchsabschnitten bestätigt werden.

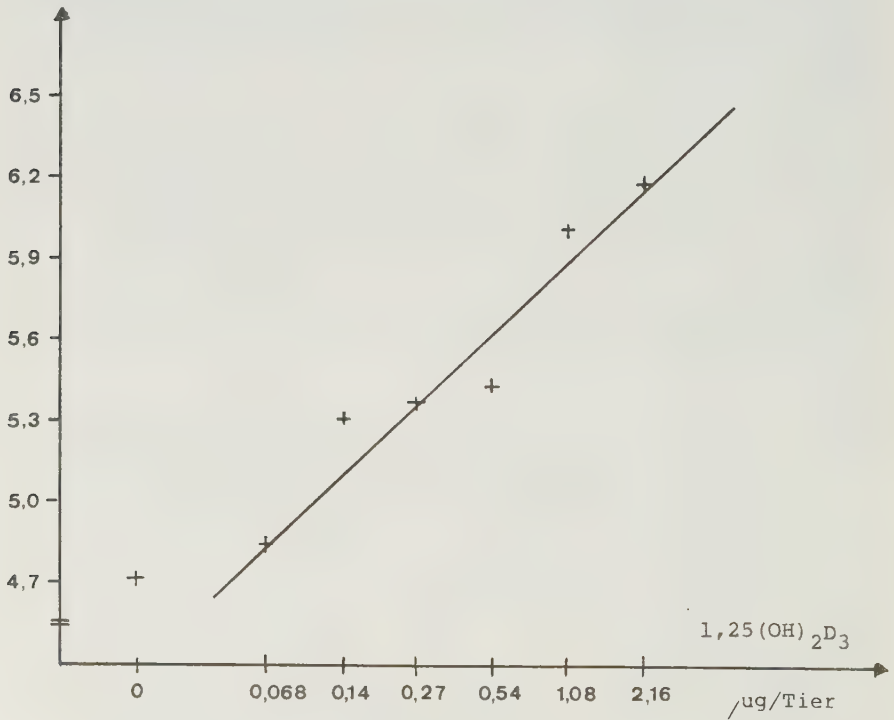
Auch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vermochte das Serumcalcium dosisabhängig zu steigern, die Erhöhung gegenüber der Vitamin D-freien Kontrollgruppe (neg. Kontrolle) war aber bedeutend geringer. Das Verhältnis der biologischen Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ betrug etwa 4:1.

$1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, in zwei Dosierungen von $0,14/\mu\text{g}$ und $0,28/\mu\text{g}$ eingesetzt, zeigte in einem Versuch die gleiche dosisabhängige Wirkung auf den Serumcalciumspiegel wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, während in einem anderen Versuchsabschnitt der Serumcalciumgehalt der $0,28/\mu\text{g}$ -Gruppe unter dem der negativen Kontrolle lag. In zwei weiteren Testabschnitten lag der Serumcalciumspiegel beider $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ -Gruppen im Bereich der Kontrollgruppe, wobei ein eventuell durch die Lagerung bedingter Wirkungsverlust der verwendeten

Abbildung 1

Einfluß der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis auf die Serumcalciumerhöhung

Serumcalcium
(mg/100ml)



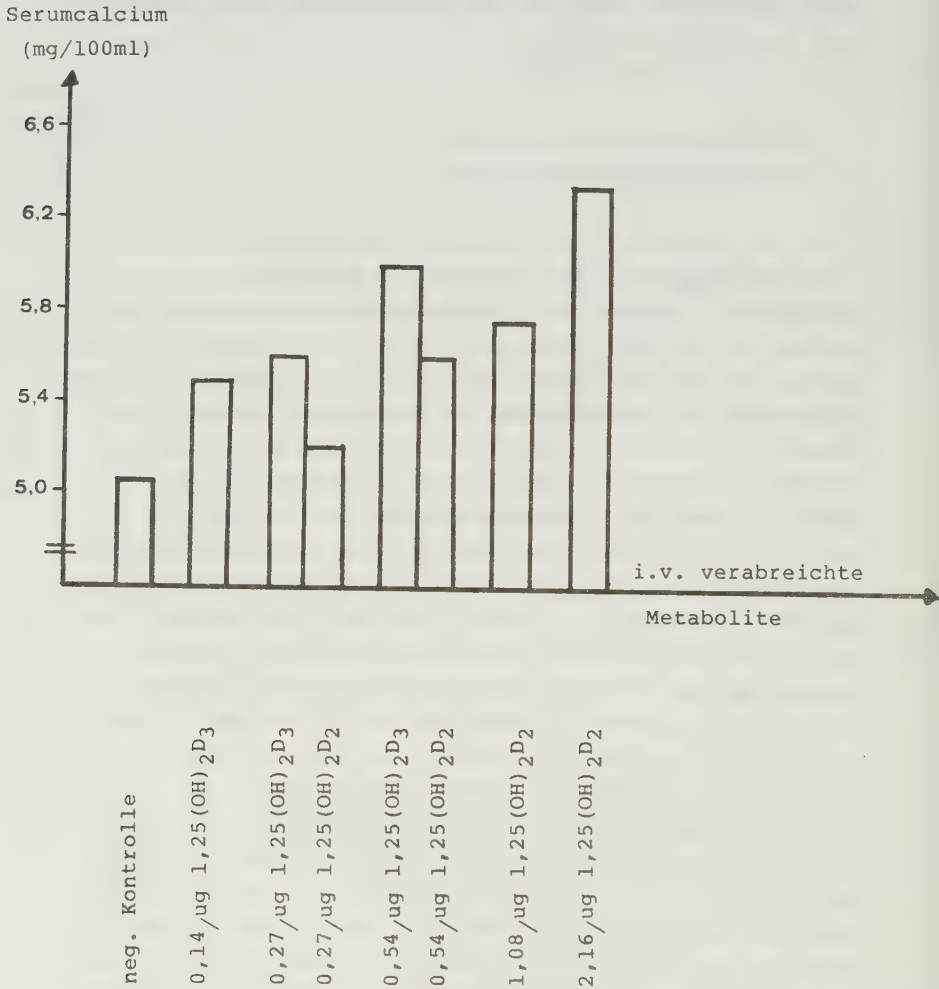
Substanz eine Erklärung sein könnte. Sollte sich jedoch in weiteren Untersuchungen eine sehr geringe Wirkung von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ auf die Knochendemineralisation bestätigen, könnte der Einsatz dieses Vitamin D-Metaboliten therapeutisch interessant sein, da die Wirkung des natürlichen Vitamin D-Metaboliten auf den Darm wesentlich stärker ist.

5.2. Calcium-Freisetzung aus den Knochen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Durch die Bestimmung des Serumcalciumspiegels nach Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ an Vitamin D-depletierte Hühnerküken konnte nachgewiesen werden, daß die biologische Wirksamkeit von synthetisch hergestelltem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ bezüglich der Knochen-calciummobilisierung geringer ist als von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Dabei zeigte sich bei intravenöser Verabreichung beider Vitamin D-Metabolite $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ nur 1/2 bis 1/3 so aktiv wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Abb.2). Dagegen stellten RAMBECK et al. (1984) in Bezug auf die CaBP-Synthese im Darm am gleichen Versuchsmodell eine 7 bis 8 mal geringere Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fest. Zum gleichen Ergebnis kamen JONES et al. (1976a), die nach intravenöser Applikation von aus Nierenmitochondrien gewonnenem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ an Hühnerküken nur 1/5 bis 1/10 des duodenalen Calciumtransportes als nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gabe beobachten konnten. Diese Untersuchungen konnten auch zeigen, daß die Ursache der Diskriminierung gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ beim Huhn nicht durch eine unterschiedliche Resorptionsrate von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bedingt sein kann, da eine geringere Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ sowohl bei oraler als auch bei intravenöser Verabreichung vorliegt. Es wurde deshalb vermutet, daß die geringere antirachitische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ beim Huhn entweder mit der schnelleren Metabolisierung dieses Vitamin D_2 -Metaboliten zu einer unwirksamen Substanz oder mit der

Abbildung 2

Wirkung⁺ verschiedener Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ auf die Calciumfreisetzung aus dem Knochen



+ gemessen als Serumcalcium in mg/100ml

schnelleren Ausscheidung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zusammenhängen könnte, zumal die Rezeptorbindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Darmzelle für beide Vitamin D-Metabolite gleich groß zu sein scheint (KREAM et al., 1977).

Die unterschiedliche Wirksamkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen und auf den intestinalen Calciumtransport deutet jedoch auf eine verschieden starke Bindung der beiden dihydroxylierten Metabolite von Vitamin D_2 und D_3 an Rezeptoren der Zielorgane hin. Würde nämlich ein gesteigerter Katabolismus von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ oder eine schlechtere Bindung des Vitamin D_2 -Metaboliten an das spezifische Vitamin D-bindende Transportprotein im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Ursache der Diskriminierung gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ beim Huhn darstellen, müßte die Wirkung des dihydroxylierten Vitamin D_2 -Metaboliten auf den Knochen und den Darm gleich groß sein. In der vorliegenden Arbeit konnte aber gezeigt werden, daß sich die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ auf die Knochencalciummobilisierung deutlich von der bereits des öfteren untersuchten Darmwirkung unterscheidet. Da jedoch bei in vitro Versuchen sowohl $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ als auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit der gleichen Affinität an den intestinalen, cytosolischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptor gebunden werden, könnte auch ein anderer, bisher unbekannter Mechanismus den Grund für die Diskriminierung gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ beim Vogel darstellen.

Weiterhin konnte in der eigenen Untersuchung eine positive Korrelation zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Menge und Serumcalciumerhöhung festgestellt werden. Die Dosis-Wirkungsbeziehung erwies sich im eingesetzten Bereich von $0,27\text{ }\mu\text{g}$ bis $2,16\text{ }\mu\text{g}$ als linear.

5.3. Freisetzung von Calcium aus den Knochen durch die kombinierte Verabreichung von zwei beziehungsweise drei verschiedenen Vitamin D-Metaboliten

Bei kombinierter Verabreichung von Vitamin D-Metaboliten beim Hühnerküken ergaben sich bezüglich verschiedener Vitamin D-abhängiger Parameter "synergistische" Effekte. Es handelt sich dabei um überadditive Wirkungen, die über die Summe der jeweiligen Einzelwirkungen hinausgehen. Diese gegenseitige Wirkungsverstärkung von zwei Vitamin D-Metaboliten konnte beim rachitischen Hühnerküken sowohl für die kombinierte Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als auch für die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ bestätigt werden (RAMBECK et al., 1985a; RAMBECK et al., 1986; RAMBECK et al., 1987a).

Es kann auch durch die Kombination von Vitamin D-Metaboliten eine gegenseitige Beeinflussung in Form einer Wirkungsabschwächung erfolgen. Am Knochen konnte durch die gemeinsame Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine dämpfende Wirkung auf die Calciumfreisetzung festgestellt werden. Dabei hatte die Kombination beider Vitamin D-Metabolite im Verhältnis 1:10 die geringste demineralisierende Wirkung (PFLÜGER, 1986). Auch bei in vitro Untersuchungen mit kultivierten Mäusekalvarien konnte bei Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine gegenseitige Potenzierung in Bezug auf die Knochenresorption festgestellt werden. Die gleichzeitige Zugabe beider Metabolite bewirkte nach 72 Stunden Inkubationszeit im Vergleich zur alleinigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gabe eine fast identische Calciumfreisetzung ins umgebende Medium (RAMBECK and HOFFMANN, 1987b). In der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich die Fragestellung deshalb darauf, ob durch die Kombination von zwei beziehungsweise drei Vitamin D-Metaboliten ein stimulierender oder hemmender Einfluß auf die Knochendemineralisation ausgeübt werden kann.

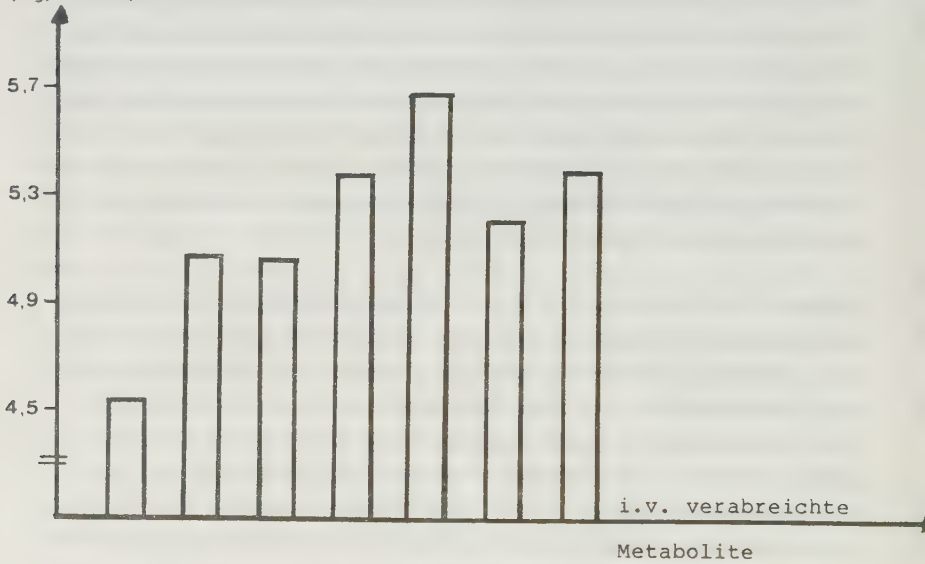
Bei der kombinierten Verabreichung von zwei Vitamin D-Metaboliten (Zweierkombinationen) zeigte die Kombination von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:2 ($0,14/\mu\text{g} + 0,27/\mu\text{g}$) den geringsten demineralisierenden Effekt. Der Serumcalciumgehalt dieser Gruppe lag unter dem, der durch die alleinige Gabe von $0,14/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erreicht wurde. Aber auch durch Kombination von $0,14/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $0,54/\mu\text{g}$ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte keine additive Wirkung auf die Calciumfreisetzung erzielt werden. Der Serumcalciumwert dieser Gruppe entsprach dem, der auch bei gemeinsamer Gabe von $0,14/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $0,14/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ gemessen wurde. Dies deutet darauf hin, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine größere Tendenz als $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ zeigt, der Knochendemineralisierung entgegenzuwirken (Abb.3).

Während die Kombination von $0,27/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $0,14/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ keine Steigerung des Serumcalciums gegenüber der alleinigen Gabe von $0,27/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erbrachte, war der Calciumgehalt bei der kombinierten Verabreichung von $0,27/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $0,28/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ stark erhöht, obwohl in der Gruppe mit $0,28/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ in diesem Versuchsabschnitt keine Wirkung erkennbar war. $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$ erwies sich bei alleiniger Gabe in Bezug auf die Knochencalciummobilisierung nur 50% so wirksam wie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, erreichte jedoch in Kombination mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen Serumcalciumwert, der über die Summe der Einzelwirkungen hinausging. $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$, das synthetische Analogon von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wurde in einem Versuchsabschnitt anstelle von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eingesetzt und mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beziehungsweise $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ kombiniert. Auch mit $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ zeigte $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Vergleich zu $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ eine geringere Wirkung auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen. Der Serumcalciumwert, der durch die Kombination von $0,13/\mu\text{g}$ $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $0,54/\mu\text{g}$ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erreicht wurde, lag unter dem der Kombinationsgruppe von $0,13/\mu\text{g}$ $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ und $0,14/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$.

Abbildung 3

Knochencalciummobilisierung durch die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Serumcalcium
(mg/100ml)



neg. Kontrolle

$0,14/\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

$0,14/\mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$

$0,27/\mu\text{g } 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

$0,14/\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
+ $0,14/\mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$

$0,14/\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
+ $0,27/\mu\text{g } 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

$0,14/\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$
+ $0,14/\mu\text{g } 1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$
+ $0,27/\mu\text{g } 24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Bei der Kombinierung von drei verschiedenen Vitamin D-Metaboliten (Dreierkombinationen) wurde durch die kombinierte Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis 1:1:2 ($0,14/\mu\text{g}$ + $0,14/\mu\text{g}$ + $0,27/\mu\text{g}$) die geringste Calciumfreisetzung aus den Knochen bewirkt (Abb.3). Der Serumcalciumgehalt dieser Gruppe lag dabei um 16% unter dem rein additiv errechneten Wert. Auch die Dreierkombination aus $0,14/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $0,14/\mu\text{g}$ $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $0,54/\mu\text{g}$ $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ergab einen Calciumspiegel, der deutlich unter der Summe der Einzelwirkungen lag, wobei in einem Versuchsabschnitt keine Erhöhung gegenüber der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gruppe ersichtlich war. Es wurde auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ mit $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ im Verhältnis 2:1:4 ($0,27/\mu\text{g}$ + $0,14/\mu\text{g}$ + $0,54/\mu\text{g}$) kombiniert. Dabei ergab sich, wie bei den Kombinationen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kein gegenseitig stimulierender Effekt bei gemeinsamer Verabreichung dieser Vitamin D-Metabolite.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es bei kombinierter Gabe verschiedener Vitamin D-Metabolite zu keiner gegenseitigen Potenzierung wie am Darm kommt. Dies wurde vor allem bei den Dreierkombinationen deutlich. Trotz der zum Teil recht geringen Unterschiede, in Verbindung mit den hohen Standardabweichungen, ist insgesamt gesehen sogar eine Tendenz für eine gegenseitige Wirkungsabschwächung erkennbar. Am deutlichsten war eine mögliche Hemmwirkung auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen bei Kombinationen mit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu sehen.

Eine schlüssige Erklärung über den Mechanismus einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung beziehungsweise -abschwächung bei kombinierter Verabreichung von Vitamin D-Metaboliten gibt es bis jetzt noch nicht. Eine mögliche Ursache für das Zustandekommen eines synergistischen Effektes könnte in der Änderung der Rezeptorenzahl bestehen. So stellten COSTA et

al. (1985) bei in vitro Versuchen mit Nierenzellkulturen eine Steigerung der Rezeptorenzahl für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nach Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ fest. Weiterhin wäre eine direkte Beeinflussung der Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Zielorganen denkbar. In einer in vitro Studie konnte durch die Anwesenheit von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die Bindungsaffinität für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an seinen Rezeptor verändert werden. Es wurde deshalb angenommen, daß am Rezeptor für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch eine Bindungsstelle für $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vorhanden sein muß (WILHELM and NORMAN, 1985).

Möglicherweise ist auch am Knochen die Tendenz für eine Wirkungsabschwächung bei Kombination verschiedener Vitamin D-Metabolite durch teilweise Besetzung der vorhandenen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren mit anderen Vitamin D-Metaboliten bedingt. Da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aber die stärkste Wirkung auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen besitzt, könnte dadurch der Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verringert werden. Die Abnahme der Knochendemineralisation bei gemeinsamer Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wäre eventuell auch durch hemmende Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Parathormonsekretion oder einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Zellaktivität erklärbar (PAVLOVITCH et al., 1981).

6. ZUSAMMENFASSUNG

In einer aus sechs Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe wurde der Einfluß von Vitamin D-Metaboliten auf die Calciumfreisetzung aus den Knochen rachitischer Hühnerküken untersucht. Dabei wurden die Vitamin D-Metabolite einzeln oder in Kombinationen verabreicht.

Die Erhöhung des Serumcalciumspiegels nach Gabe von Vitamin D-Metaboliten bei calciumfrei ernährten Tieren stellt ein Maß für die Knochendemineralisation dar. Es zeigte sich, daß zwischen der intravenös verabreichten Metabolitdosis und dem Anstieg des Serumcalciums eine direkte Abhängigkeit besteht. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erwies sich als wirksamster Stimulator der Calciumfreisetzung aus den Knochen. Die Dosiswirkungsbeziehung war dabei im Bereich von $0,068/\mu\text{g}$ bis $2,16/\mu\text{g}$ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ linear. Nach Gabe von $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ war die Erhöhung des Serumcalciumspiegels weniger deutlich als nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Verabreichung.

Beim Vergleich der biologischen Wirksamkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich der Calciumfreisetzung aus den Knochen erwies sich der Ergocalciferol-Metabolit einhalb bis ein drittel so aktiv wie der entsprechende Cholecalciferol-Metabolit. Somit liegt beim Huhn auch eine Diskriminierung gegenüber der durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ ausgelösten Demineralisierung am Zielorgan Knochen vor. Der Grad dieser Diskriminierung ist allerdings deutlich geringer als bei der Wirkung auf den Darm.

Durch die kombinierte Verabreichung von zwei beziehungsweise drei Vitamin D_3 -Metaboliten konnte gezeigt werden, daß es am Knochen, im Gegensatz zur Calciumabsorption am Darm, zu keiner gegenseitigen Wirkungsverstärkung kommt. Bei der kom-

binierten Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im molaren Verhältnis von 1:2 beziehungsweise bei der kombinierten Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Verhältnis von 1:1:2 wurde der geringste demineralisierende Effekt erzielt.

Da diese gegenseitige Wirkungsverstärkung also nur die Calciumabsorption im Darm und nicht die Demineralisation des Knochens betrifft, könnte die kombinierte Verabreichung von Vitamin D-Metaboliten die Calciumbilanz des Körpers positiv beeinflussen. Dies wäre von hohem therapeutischem Interesse.

SUMMARY

Bone demineralization in chicken under the influence of vitamin D-metabolites and their combinations

In a series of six experiments the influence of vitamin D-metabolites on bone calcium mobilization was studied in rachitic chicks. The vitamin D-metabolites were dosed alone or in combinations.

The increase of serumcalcium after administration of vitamin D-metabolites to animals, which were fed a Ca-deficient diet, is a measure of bone demineralization. There was a direct relation between the intravenous dosed amount of metabolites and the elevation of serumcalcium. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was the most potent stimulator of bone calcium mobilization. The dose response curve was linear in the range between 0,068/ μg and 2,16/ μg . After administration of $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$, $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1(\text{OH})\text{D}_3$ the increase of serumcalcium was less pronounced.

Comparing the biological activity of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concerning bone calcium mobilization the ergocalciferolemetabolite was only 1/2 to 1/3 as active as the corresponding cholecalciferolemetabolite. Therefore in chickens a discrimination against $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ does exist in bone too. The intensity of discrimination however is clearly smaller than in the intestine.

The combined and simultaneous administration of two or three vitamin D-metabolites showed no synergistic effect as it was seen in the calciumabsorption from intestine. In this study the simultaneous administration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the ratio of 1:2 respectively the simul-

taneous administration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the ratio of 1:1:2 showed the weakest effect on calcium release from bone.

Since this synergistic effect concerns only the calciumabsorption from intestine but not the demineralization of bone, the combined and simultaneous administration of vitamin D-metabolites might influence positively the calcium-balance. This might be of great therapeutic interest.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMS, T.H. and A.W. NORMAN (1970):

Studies on the mechanism of action of calciferol. I. Basic parameters of vitamin D-mediated calcium transport.

J. Biol. Chem. 245, 4421-4431

AKIBA, T., H. ENDOM, C. KOSEKI, F. SAKAI, N. HORIUCHI, T. SUDA (1980):

Localization of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase activity in the mammalian kidney.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 313-318

AMEENUDIN, S., M. SUNDE, H.F. DeLUCA, N. IKEKAWA, Y. KOBAYAS (1982):

24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃; is it required for embryonic development in the chicks?

Science 217, 451-452

AMENTO, E.P., A.K. BHALLA, J.T. KURNICK, R.L. KRADIN, T.L. CLEMENS,

S.A. HOLICK, M.F. HOLICK, S.M. KRANE (1984):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces maturation of the human monocyte cell line U 937, and, in association with a factor from human T lymphocytes, augments production of the monokine mononuclear cell factor.

J. Clin. Invest. 73, 731-739

AVIOLI, L.V., S.W. LEE, J.E. McDONALD, J. LUND, H.F. DeLUCA (1967):

Metabolism of D₃-³H in human subjects. Distribution in blood, bile, feces and urine.

J. Clin. Invest. 46, 983-992

AVIOLI, L.V., S.J. BIRGE, S.W. LEE (1968):

Effects of prednisone on vitamin D metabolism in man.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1341-1346

AVIOLI, L.V. and T.J. HAHN (1978):

Steroid-induced osteopenia.

In: Endocrinology of calcium metabolism.

(Ed. O.H. Copp, R.V. Talmage)

Excerpta Medica, Amsterdam, 23

BARTON, B.A., D.W. HOCHNETT, N.A. JORGENSEN, H.F. DeLUCA (1984):

24,25-dihydroxyvitamin D₃ administration increases incidence of parturient paresis.

J. Dairy Sci. 67, 1236-1239

BELL, N.H., S. SHAW, R.T. TURNER (1984):

Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man.

J. Clin. Invest. 74, 1540-1544

BELSEY, R.E., H.F. DeLUCA, J.T. POTTS (1974):

Selective binding properties of vitamin D transport protein in chick plasma in vitro.

Nature 247, 208-209

BERESFORD, J.N., J.A. GALLAGHER, J.W. POSER, R.G.G. RUSSELL (1984):

Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, PTH and glucocorticoids.

Metab. Bone Dis. and Rel. Res. 5, 229-235

BHATTACHARYYA, M. and H.F. DeLUCA (1974):

Subcellular location of rat liver calciferol-25-hydroxylase.

Arch. Biochem. Biophys. 160, 58-62

BISHOP, C.W., N.C. KENDRICK, H.F. DeLUCA (1983):

Induction of calcium-binding protein before 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ stimulation of duodenal calcium uptake.

J. Biol. Chem. 258, 1305-1310

BJÖRKHEM, I. and I. HOLMBERG (1979):

On the 25-hydroxylation of vitamin D₃ in vitro studied with a mass fragmentographic technique.

J. Biol. Chem. 254, 9518-9524

BJÖRKHEM, I., I. HOLMBERG, H. OFTEBRO, J.S. PEDERSEN (1980):

Properties of a reconstituted vitamin D₃-25-hydroxylase from liver mitochondria.

J. Biol. Chem. 255, 5244-5249

BOASS, A., S.U. TOVERUD, T.A. MCCAIN, J.W. PIKE, M.R. HAUSSLER (1977):

Elevated serum levels of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol in lactating rats.

Nature 267, 630-632

BORDIER, P.A., H. RASMUSSEN, P. MARIE, L. MIRAVET, J. GUERIS, A. RYCKWAERT (1978):

Vitamin D metabolites and bone mineralization in man.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 284-294

BORIS, A., J.F. HURLEY, T. TRMAL (1980):

In vivo mobilization of bone calcium in thyroparathyroectomized rats by 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol (calcitriol) and related compounds.

J. Nutr. 110, 2291-2296

BOUILLON, R. and H. VAN BAELEN (1981a):

Transport of vitamin D: Significance of free and total concentration of the vitamin D metabolites.

Calcif. Tissue Int. 33, 451-453

BOUILLON, R., F.A. VAN ASSCHE, H. VAN BAELEN, W. HEYNS,

P. DeMOOR (1981b):

Influence of the vitamin-D-binding-protein on the serum concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

J. Clin. Invest. 67, 589-596

BOYLE, I.T., J.L. OMDAHL, R.W. GRAY, H.F. DeLUCA (1973):

The biological activity and metabolism of 24,25-dihydroxyvitamin D_3 .

J. Biol. Chem. 248, 4174-4180

BROMMAGE, R., K. JARNAGIN, H.F. DeLUCA, S. YAMADA,

H. TAKAYAMA (1983):

1-but not 24-hydroxylation of vitamin D is required for skeletal mineralization in rats.

Am. J. Physiol. 244, E298-E304

BRUMBAUGH, P.F., M.R. HUGHES, M.R. HAUSSLER (1975):

Cytoplasmic and nuclear binding components for $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D_3 in chick parathyroid glands.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4871-4875

BRUNETTE, M., M. CHAN, C. FERRIERE, K.D. ROBERTS (1978):

Site of $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 synthesis in the kidney.

Nature 276, 287-289

BURGER, E.H., J.W.M. VAN DER MEER, J.S. VAN DE GREVEL,

J.C. GRIBNAU, C.W. THESINGH, R. VAN FURTH (1982):

In vitro formation of osteoclasts from longterm culture of bone marrow mononuclear phagocytes.

J. Exp. Med. 156, 1604-1614

CHARLES, M.A., J. MARTIAL, D. ZOLOCK, R. MORRISSEY,

J.D. BAXTER (1981):

Regulation of calcium-binding protein messenger RNA by
1,25-dihydroxycholecalciferol.

Calcif. Tissue Int. 33, 15-18

CLEMENS, T.L., L.J. FRAKER, L.M. SANDLES, J.L.H. O'RIORDAN (1981):

Detection of 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃ in human serum
by radioimmunoassay.

In: Hormonal control of calcium metabolism.

(Ed. D.V. Cohn, R.V. Talmadge, J.L. Mathews)

Excerpta Medica, Amsterdam, 366

COLETTE, C., L. MONNIER, F. BLOTMAN, P. BALDET, F. BONNEL (1986):

Effects of long term gluco-corticoid treatments on calcium
intestinal absorption and vitamin D metabolism.

In: Ninth international conference on calcium regulating
hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 388

CORVOL, M.T., M.F. DUMONTIER, M. GARABEDIAN, R. RAPPAPORT (1978):

Vitamin D and cartilage II. Biological activity of 25-hydroxy-
cholecalciferol, 24,25- and 1,25-dihydroxycholecalciferol on
cultured growth plate chondrocytes.

Endocrinology 102, 1269-1274

CORVOL, M.T., M.F. DUMONTIER, A. ULMAN, M. GARABEDIAN,

G. WITMER (1979):

Nuclear binding of 24,25(OH)₂D₃ and its effect on DNA
polymerase activities in cultured chondrocytes.

In: Vitamin D: Basic research and its clinical application

(Ed. A.W. Norman, K. Schaefer, D. von Herrath, H.G. Grigoleit,

J.W. Coburn, H.F. DeLuca, E.B. Mawer, T. Suda)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, 419-424

COSTA, E.M., M.A. HIRST, D. FELDMAN (1985):

Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors by vitamin D analogs in cultured mammalian cells.

Endocrinology 117, 2203-2210

CRILLY, R.G., A. HORSMAN, M. PEACOCK, B.E.C. NORDIN (1981):

The vitamin D metabolites in the pathogenesis and management of osteoporosis.

Curr. Med. Res. Opin. 7, 337-348

CUNDY, T., J.A. KANIS, S. PATON, R. SMITH, G.T. WARNER, M. BARTLETT, R.G.G. RUSSELL (1979):

The biological effects of 1,24,25-trihydroxyvitamin D₃ in man.

Metab. Bone Dis. and Rel. Res. 1, 295-298

DEKEL, S., R. SALAMA, S. EDELSTEIN (1983):

The effect of vitamin D and its metabolites on fracture repair in chicks.

Clin. Sci. 65, 429-436

DELLING, G. (1981):

Der Einfluß von 1,25-Dihydroxycholecalciferol auf die renale Osteopathie.

Nieren- und Hochdruckkrankheiten 10, 159-165

DeLUCA, H.F. (1974):

Vitamin D: The vitamin and the hormone.

Fed. Proc. 33, 2211-2219

DeLUCA, H.F. (1979):

The vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.

Nutr. Rev. 37, 161-193

DeLUCA, H.F. and J.G. GHAZARIAN (1980):

The role of vitamin D and its metabolites in calcium and phosphate metabolism.

In: Handbuch der inneren Medizin VI/1A, Knochen, Gelenke, Muskeln.

(Ed. F. Kuhlencordt, H. Bartelheimer)

Springer Verlag, Berlin, 173-196

DeLUCA, H.F. (1981):

Recent advances in the metabolism of vitamin D.

Ann. Rev. Physiol. 43, 199-209

DeLUCA, H.F. and H.K. SCHNOES (1983):

Vitamin D: Recent advances.

Ann. Rev. Biochem. 52, 411-439

DELVIN, E.E., A. ARABIAN, F.H. GLORIEUX (1978):

Kinetics of liver microsomal cholecalciferol 25-hydroxylase in vitamin D-depleted and -repleted rats.

Biochem. J. 172, 417-422

DICKSON, I.R., A.K. HALL, S.S. JANDE (1984):

The influence of dihydroxylated vitamin D metabolites on bone formation in the chick.

Calcif. Tissue Int. 36, 114-122

DOKOH, S., C.A. DONALDSON, S.L. MARIAN, J.W. PIKE,

M.R. HAUSSLER (1983):

The ovary: New target organ for 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Endocrinology 112, 200-206

DRESCHER, D., H.F. DeLUCA, M.H. IMRIE (1969):

On the site of discrimination of chicks against vitamin D₂.

Arch. Biochem. Biophys. 130, 657-661

EDELSTEIN, S., D. NOFF, A. MATITIAHU, R. SAPIR, A. HARELL (1977):

The functional metabolism of vitamin D in rats treated with cortisol.

FEBS Lett. 82, 115-120

ESVELT, R.P., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1979):

Isolation and characterization of 1-hydroxy-23-carboxy-tetranor-vitamin D₃: A major metabolite of vitamin D₃.

Biochemistry 18, 3977-3983

ESVELT, R.P., H.F. DeLUCA, J.K. WICHMAN, S. YASHIZAWA, J. ZURCHER,

M. SOR, W.E. STUMPF (1980):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulated increase of 7-dehydro-cholesterol levels in rat skin.

Biochemistry 19, 6158-6161

ESVELT, R.P. and H.F. DeLUCA (1981):

Calcitroic acid: Biological activity and tissue distribution studies.

Arch. Biochem. Biophys. 206, 403-413

FORTE, L.R., S.G. LANGELOTTIG, H.V. BIELLIER, R.E. POELLING,

L. MAGLIOLA (1983):

Up-regulation of kidney adenylate cyclase in egg-laying hen: Role of estrogens.

Am. J. Physiol. 245, E273-E280

FRANCESCHI, R.T. and H.F. DeLUCA (1981):

Characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent calcium uptake in cultured embryonic chick duodenum.

J. Biol. Chem. 256, 3840-3847

FRASER, D.R. (1981):

Biochemical and clinical aspects of vitamin D function.

Br. Med. Bull. 37, 37-42

GARABEDIAN, M., H. PAVLOVITCH, C. FELLOTT, S. BALSON (1974a):

Metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃ in anephric rats: A new active metabolite.

Proc. Natl. Sci. USA 71, 554-557

GARABEDIAN, M., Y. TANAKA, M. HOLICK, H.F. DeLUCA (1974b):

Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in thyroparathyroidectomized rats.

Endocrinology 94, 1022-1027

GARABEDIAN, M., M. LIEBERHERR, T.M. N'GUYEN, M.T. CORVOL,

M.B. DUBOIS, S. BALSAN (1978):

In vitro production and activity of 24,25-dihydroxycholecalciferol in cartilage and calvarium.

Clin. Orthop. Rel. Res. 135, 241-248

GERTNER, J.M., R.L. HORST, A.E. BROADUS (1979):

Parathyroid hormone function and vitamin D metabolism during human growth hormone replacement.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 49, 185-189

GHAZARIAN, J.G. and H.F. DeLUCA (1974):

25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: A specific requirement for NADPH and a hemoprotein component in chick kidney mitochondria.

Arch. Biochem. Biophys. 160, 63-72

GHIJEN, W.E.J.M. and C.H. VAN OS (1982):

Regulation of Ca-ATPase and active Ca transport in basolateral plasmamembranes by 1,25(OH)₂D₃ in rat duodenum.

Proc. Fifth Workshop on Vitamin D, Williamsburg, VA,

Feb.14.-19., 1982, S.106

HADDAD, J.G., J.R. and T.J. HAHN (1973):

Natural and synthetic sources of circulating 25-hydroxy-vitamin D in man.

Nature 244, 515-517

HAINING, S.A., T. CUNDY, D.F. GUILLAND-CUMMING, J. BUTLER, J.A. KANIS (1986):

Parathyroid hormone independent increase in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ production during lactation: A prolactin mediated effect on the 1α -hydroxylase in man?

In: Ninth international conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 19

HARDEN, D., R. KUMAR, M.F. HOLICK, H.F. DeLUCA (1976):

Side chain metabolism of 25-hydroxy-(26,27- ^{14}C)vitamin D_3 and 1,25-dihydroxy-(27,27- ^{14}C)vitamin D_3 in vivo.

Science 193, 493-494

HEDLUND, T., A. HULTH, O. JOHNNELL (1983):

Early effects of parathormone and calcitonin on the number of osteoclasts and on serum calcium in rats.

Acta. Orthop. Scand. 54, 802-804

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1974):

Renal 25-hydroxyvitamin D_3 -1-hydroxylase: Involvement of cytochrom P-450 and other properties.

J. Biol. Chem. 249, 7529-7535

HENRY, H.L., A.N. TAYLOR, A.W. NORMAN (1977):

Response of chick parathroid gland to the vitamin D metabolites 1,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol.

J. Nutr. 107, 1918-1926

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1978):

Vitamin D: Two hydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability.

Science 217, 835-837

HENRY, H.L. (1979):

Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and in primary cultures of chick kidney cells.

J. Biol. Chem. 254, 2722-2729

HENRY, H.L. and A.W. NORMAN (1984):

Vitamin D: Metabolism and biological actions.

Ann. Rev. Nutr. 4, 493-520

HIGAKI, M., M. TAKAHASHI, T. SUZUKI, Y. SAHASHI (1965):

Metabolic activities of vitamin D in animals. III. Biogenesis of vitamin D sulfate in animal tissues.

J. Vitaminol. 11, 261-265

HIRST, M. and D. FELDMAN (1982):

Glucocorticoids down regulate the number of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptors in mouse intestine.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 1590-1596

HOLICK, M.H., A. KLEINER-BOSSALLER, H.K. SCHNOES, P.M. KASTEN,

J.T. BOYLE, H.F. DeLUCA (1973):

1,24,25-trihydroxyvitamin D₃ metabolite of vitamin D₃ effective in intestine.

J. Biol. Chem. 19, 6691-6696

HOLICK, M.F., L.A. BAXTER, P.K. SCHRAUFROGEL, T.E. TAVELA,

H.F. DeLUCA (1976):

Metabolism and biological activity of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in the chick.

J. Biol. Chem. 251, 397-402

HOLICK, M.F. and M.B. CLARK (1978):

The photobiogenesis and metabolism of vitamin D.
Fed. Proc. 37, 2567-2574

HOLICK, M.F. (1981):

The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: A unique
photoendocrine system.
J. Invest. Dermatol. 77, 51-58

HOLICK, M.F., J. MacLAUGHLIN, J.A. PARRISH, R.R. Anderson (1982):

Photochemistry and photobiology of vitamin D.
In: Photomedicine (Ed. J.D. Regan and J.A. Parrish)
Plenum Press, New York, 195-218

HOLLANDER, D. (1981):

Intestinal absorption of vitamins A, E, D and K.
J. Lab. Clin. Med. 97, 449-462

HOLTROP, M.E. and L.G. RAISZ (1979):

Comparison of effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol, prosta-
glandin E₂ and osteoclast-activating factor with parathyroid
hormone on the ultrastructure of osteoclasts in cultured
long bones of fetal rats.
Calcif. Tissue Int. 29, 201-205

HORST, R.L., E.T. LITTLEDIKE, J.L. RILEY, J.L. NAPOLI (1981):

Quantitation of vitamin D and its metabolites and their
plasma concentrations in five species of animals.
Anal. Biochem. 116, 189-203

HORST, R.L., J.L. NAPOLI, E.T. LITTLEDIKE (1982):

Discrimination in the metabolism of orally dosed ergocalciferol
and cholecalciferol by the pig, rat and chick.
Biochem. J. 204, 185-189

HORST, R.L., T.A. REINHARDT, C.F. RAMBERG, N.J. KOSZEWSKI.

J.L. NAPOLI (1986):

24-hydroxylation of 1,25-dihydroxyergocalciferol an unambiguous deactivation process.

J. Biol. Chem. 261, 9250-9256

HOWARD, G.A., R.T. TURNER, D.J. SHERRARD, D.J. BAYLINK (1981):

Human bone cells in culture metabolize $25(\text{OH})\text{D}_3$ to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

J. Biol. Chem. 256, 7738-7740

HUGHES, M.R., D.J. BAYLINK, P.G. JONES, M.R. HAUSSLER (1976):

Radioligand receptor assay for 25-hydroxyvitamin D_2/D_3 and $1,25$ -dihydroxyvitamin D_2/D_3 .

J. Clin. Invest. 58, 61-70

HULDSCHINSKY, K. (1919):

Heilung durch künstliche Höhensonne.

Dtsch. Med. Wschr. 45, 712-713

HUNT, R.D., F.G. GARCIA, D.M. HEGSTED (1967):

A comparison of vitamin D_2 and D_3 in new world primates.

I. Production and regression of osteodystrophia fibrosa.

Lab. Anim. Care 17, 222-234

IMRIE, M.H., P.F. NEVILLE, A.W. SNELGROVE, H.F. DeLUCA (1967):

Metabolism of vitamin D_2 and vitamin D_3 in the rachitic chick.

Arch. Biochem. Biophys. 120, 525-532

JONES, G., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1975):

Isolation and identification of 1,25-dihydroxyvitamin D_2 .

Biochemistry 14, 1250-1256

- JONES, G., L.A. BAXTER, H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES (1976a):
Biological activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ in the chick.
Biochemistry 15, 713-716
- JONES, G., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1976b):
An in vitro study of vitamin D₂-hydroxylase in the chick.
J. Biol. Chem. 251, 24-28
- JONES, G., A. ROSENTHAL, D. SEGEV, Y. MAZUR, F. FROLOW, Y. HALFON,
D. RABINOVICH, Z. SHAKKED (1979):
Isolation and identification of 24,25-dihydroxyvitamin D₂
using the perfused rat kidney.
Biochemistry 18, 1094-1102
- JONES, G., K. KANO, S. YAMADA, T. FURUSAWA, H. TAKAYAMA,
T. SUDA (1984):
Identification of 24,25,26,27-tetranor-23-hydroxyvitamin D₃
as a product of the renal metabolism of 24,25-dihydroxy-
vitamin D₃.
Biochemistry 23, 3749-3754
- JORGENSEN, N.A. (1982):
Parturient paresis: Cause, treatment, prevention.
Presented at symposium sponsored by the faculty of veterinary
medicine, Depts. of nutrition and biochemistry,
National University, Mexico City, August 17.
- JUDD, H.J. and S.G. KARENMAN (1982):
Effects of aging on reproductive function in women.
In: Endocrine aspects of aging. (Ed. S Karenman, L.V. Avioli)
New York, Amsterdam, Oxford; Elsevier Biomedical, S. 163-197

KANIS, J.A., T. CUNDY, M. BARLETT, R. SMITH, G. HEYNEN,
G.T. WARNER, R.G.G. RUSSELL (1978):

Is 24,25-dihydroxycholecalciferol a calcium-regulating
hormone in man?

Br. Med. J. 1, 1382-1386

KANIS, J.A., D. GUILLAND-CUMMING, A.D. PATERSON, R.G.G.
RUSSELL (1982):

The role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in
calcium homeostasis.

In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical
endocrinology of calcium metabolism.

(Ed. A.W. Norman, K. Schäfer, D. von Herrath, H.G.
Grigoleit)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, 157-167

KHANDEKAR, K.N., D.M. DUBEWAR, S.A. SURYAWANSHI (1986):

Role of gonadal steroids in regulating of plasma and bone
electrolytes (Ca, Na, and K) in the lizard *Calotes versicolor* (daudin).

In: Ninth international conference on calcium regulating
hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 347

KLEINER-BOSSALLER, A. and H.F. DeLUCA (1974):

Formation of $1,24,25$ -trihydroxyvitamin D_3 from
 $1,25$ -dihydroxy-vitamin D_3 .

Biochem. Biophys. Acta. 388, 489-495

KO, J.S. and G.W. BERNARD (1981):

Osteoclast formation in vitro from bone marrow mononuclear
cells in osteoclast free bone.

Am. J. Anat. 161, 415-425

KREAM, B.E., M.J.L. JOSE, H.F. DeLUCA (1977):

The chick intestinal cytosol binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: A study of analog binding.

Arch. Biochem. Biophys. 179, 462-468

KREUTTER, D., T. MATSUMOTO, R. PECKHAM, K. ZAWALICH, W.H. WEN, D.T.

ZOLOCK, H. RASMUSSEN (1983):

The effect of essential fatty acid deficiency on the stimulation of intestinal calcium transport by

1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. 258, 4977-4981

KRUSE, H.P. (1985):

Behandlung mit Vitamin D, D-Hormonen und synthetischen Analogen.

Dtsch. Med. Wschr. 110, 66-70

KULKOWSKI, J.A., T. CHAN, J. MARTINEZ, J.A. GHAZARIAN (1979):

Modulation of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase by aminophylline: A cytochrome P-450 monooxygenasesystem.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 50-57

KUMAR, R., D. HARNDEN, H.F. DeLUCA (1978):

Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D₃- and 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase.

J. Biol. Chem. 253, 3804-3809

KUMAR, R., W.R. COHEN, P. SILVA, F.H. EPSTEIN (1979):

Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D plasma levels in normal human pregnancy and lactation.

J. Clin. Invest. 63, 342-344

KUMAR, R., S. NAGUBANDI, J.M. LONDOWSKI (1980a):

Enterohepatic physiology of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Clin. Invest. 65, 277-284

KUMAR, R., C.F. ABBODD, B.L. RIGGS (1980b):

The effect of elevated prolactin levels on plasma 1,25-dihydroxy-vitamin D and intestinal absorption of calcium.

Mayo. Clin. Proc. 55, 51-53

KUMAR, R., S. NAGUBANDI, J.M. LONDOWSKI (1981):

Production of a polar metabolite of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in a rat liver perfusion system.

Dig. Dis. Sci. 26, 242-246

KUMAR, R., J.M. LONDOWSKI, M.P. MURARI, S. NAGUBANDI (1982):

Synthesis and biological activity of vitamin D₂-3 β -glucosiduronate and vitamin D₂-3 β -sulfate: Role of vitamin D₂ conjugates in calcium homeostasis.

J. Steroid Biochem. 17, 495-502

LAM, H.Y., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1975):

Synthesis and biological activity of 25,26-dihydroxycholecalciferol.

Steroids 25, 247-256

LEMIRE, J.M., J.S. ADAMS, R. SAKAI, S.C. JORDAN (1984):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells.

J. Clin. Invest. 74, 657-661

LE VAN, L.W., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1981):

Isolation and identification of 25-hydroxyvitamin D₂-25-glucuronide: A biliary metabolite of vitamin D₂ in the chick.

Biochemistry 20, 222-226

LITTLEDIKE, E.T. and R.L. HORST (1982):

Metabolism of vitamin D₃ in nephrectomized pigs given pharmacological amounts of vitamin D₃.

Endocrinology 111, 2008-2013

LJUNGHALL, S., H. LITHELL, L. LIND (1985):

Assessment of the role of vitamin D in insulin secretion.

In: Vitamin D (Ed. A.W. Norman)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, 853-857

LLACH, F., A.S. BRICKMAN, F.R. SINGER, J.W. COBURN (1979):

24,25-dihydroxycholecalciferol, a vitamin D sterol with qualitatively unique effects in uremic man.

Metab. Bone Dis. and Rel. Res. 2, 11-15

LUCAS, P.A., B. LACOUR, T. DRÜEKE (1986):

Rapid in vitro stimulation of Ca^{2+} influx into isolated rat enterocytes by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: Possible role of alteration in polyamine metabolism.

In: Ninth international conference on calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 75

LUND, J. and H.F. DeLUCA (1966):

Biological active metabolite of vitamin D_3 from bone, liver and blood serum.

J. Lipid Res. 7, 739-744

MALLUCHE, H.H., C. MATTHEWS, M.C. FAUGERE, P. FANTI, R.M.

FRIEDLER (1986):

$1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 maintains activity of bone cells and parathyroid hormone modulates number of bone cells in dogs with renal failure.

In: Ninth international conference of calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 377

MALONE, J.D., S.L. TEITELBAUM, G.L. GRIFFIN, R.M. SENIOR,
A.J. KAHN (1982):

Recruitment of osteoclast precursors by purified bone
matrix constituents.

J. Cell. Biol. 92, 227-230

MASSRY, S.G., S. TUMA, S. DUA, D.A. GOLDSTEIN (1979):

Reversal skeletal resistance to parathyroid hormone in
uremia by vitamin D metabolites.

J. Lab. Clin. Med. 94, 152-157

MATSUMOTO, T., N. HORIUCHI, T. SUDA, H. TAKAHASHI, E. SHIMAZAWA,
E. OGATA (1979):

Failure to demonstrate stimulatory effect of prolactin on
vitamin D metabolism in vitamin D deficient rats.

Metabolism 28, 925-927

Mc COLLUM, E.V., N. SIMMONDS, J.E. BECKER, P.G. SHIPLEY (1922):

Studies on experimental rickets. XXI. An experimental
demonstration of the existence of a vitamin which
promotes calcium deposition.

J. Biol. Chem. 53, 293-312

MELLANBY, E. (1918):

The part played by an accessory factor in the production of
experimental rickets.

J. Physiol. 52, 11-14

MERKE, J. and A.W. NORMAN (1981):

Studies on the mode of calciferol. XXXII. Evidence for a
 $24R,25(OH)_2$ vitamin D_3 -receptor in parathyroid gland of
the rachitic chick.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 551-558

MERKE, J., D. SCHWITTAY, G. FÜRSTENBERGER, M. GROSS, F. MARKS,
E. RITZ (1985a):

Demonstration and characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃
receptors in basal cells of epidermis of neonatal and adult mice.
Calcif. Tissue Int. 37, 257-267

MERKE, J., U. HÜGEL, E. RITZ (1985b):

Nuclear testicular 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in
sertoli cells and seminiferous tubulus of adult rodents.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 303-309

MILLER, S.M. (1983):

New perspectives of vitamin D.
Am. J. Med. Tech. 49, 27-37

MIRAVET, L., J. GUERIS, J. REDEL, A.W. NORMAN, A. RYCKWAERT (1981):

Action of vitamin D metabolites on PTH secretion in man.
Calcif. Tissue Int. 33, 191-194

MUNSON, P.L. and P.F. HIRSCH (1966):

Thyrocalcitonin: Newly recognized thyroid hormone concerned
with metabolism of bone.
Clin. Orthop. 49, 209-232

NAGUBANDI, S., R. KUMAR, J.M. LONDOWSKI, R.A. CORRADINO,

P. TIETZ (1980):

The role of vitamin D glucosiduronate in calcium homeostasis.
J. Clin. Invest. 66, 1274-1280

NAGUBANDI, S., J.M. LONDOWSKI, S. BOLLMAN, P. TIETZ,

R. KUMAR (1981):

Synthesis and biological activity of vitamin D₃-3 β -sulfate.
J. Biol. Chem. 256, 5536-5539

NAPOLI, J.L., B.C. PRAMANIK, J.J. PARTRIGDE, M.R. USKOKOVIC,
R.L. HORST (1982):

23S,25-dihydroxyvitamin D₃ as a circulating metabolite of
vitamin D₃. Its role in 25-hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone
biosynthesis.

J. Biol. Chem. 257, 9634-9639

NAPOLI, J.L., B.C. PRAMANIK, P.M. ROYAL, T.A. REINHARDT,
R.L. HORST (1983):

Intestinal synthesis of 24-keto-1,25-dihydroxyvitamin D₃: A
metabolite with high affinity for the vitamin D cytosolic receptor.

J. Biol. Chem. 258, 9100-9107

NARBAITZ, R., W.E. STUMPF, M. SAR, S. HUANG, H.F. DeLUCA (1983):

Autoradiographic localization of target cells for 1,25-dihydroxy-
vitamin D₃ in bones from fetal rats.

Calcif. Tissue Int. 35, 177-182

NEMERE, J. and A.W. NORMAN (1986):

1,25(OH)₂D₃-stimulated vesicular transport of calcium in chick
duodenum: Lysosomes and endocytic vesicles.

In: Ninth international conference of calcium regulating
hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 366

NIJWEIDE, P.J., E.H. BURGER, J.H.M. FEYEN (1986):

Cells of bone: Proliferation, differentiation, and hormonal
regulation.

Physiol. Rev. 66, 855-886

NORMAN, A.W. (1979a):

Vitamin D metabolism and calcium absorption.

Am. J. Med. 67, 989-998

NORMAN A.W. (1979b):

Vitamin D: The calcium homeostatic steroid hormone.
Academic Press, New York, S.39

NORMAN, A.W., J. ROTH, L. ORCI (1982):

The vitamin D endocrine system: Steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins).
Endocr. Rev. 3, 331-366

NORMAN, A.W. (1984):

Hormonal actions of vitamin D.
Current Topics in Cellular Regulations 24, 35-49

OHNUMA, N. and A.W. NORMAN (1982):

Production in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone from 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by rat small intestine mucosa homogenates.
Arch. Biochem. Biophys. 213, 139-147

OIKAWA, A. and M. NAKAYASU (1974):

Stimulation of melanogenesis in cultured melanoma cells by calciferol.
FEBS Lett. 42, 32-35

OKAMURA, W.H., M.N. MITRA, R.M. WING, A.W. NORMAN (1974):

Chemical synthesis and biological activity of 3-deoxy-1 - hydroxyvitamin D₃ an analog of 1,25-(OH)₂D₃, the active form of vitamin D₃.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 179-185

OLSON, E.B., J.C. KNUTSON, M.H. BHATTACHARYYA, H.F. DeLUCA (1976):

The effect of hepatectomy of the synthesis of 25-hydroxy-vitamin D₃.
J. Clin. Invest. 57, 1213-1220

ONISKO, B., R.P. ESVELT, H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1980):

Excretion of metabolites of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in rat bile.

Arch. Biochem. Biophys. 205, 175-179

ORNOY, A., D. GOODWIN, D. NOFF, S. EDELSTEIN (1978):

24,25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation.

Nature 276, 517-519

PARFITT, M.A., C.H.E. MATHEWS, R. BROMMAGE, K. JARNAGIN,

H.F. DeLUCA (1984):

Calcitriol but no other metabolite of vitamin D is essential for normal bone growth and development in the rat.

J. Clin. Invest. 73, 576-586

PARSONS, J.A. (1978):

Functional interaction between vitamin D-metabolism and other calcium regulating hormones.

In: Vitamin D (Ed. D.E.M. Lawson)

Academic Press, New York, 387-415

PARTRIDGE, J.J., S.J. SHIUEY, N.K. CHADHA, E.G. BAGGIOLINI, P.N.

CONFALONE, J. KULESKA, P. WOWKULICH, M.R. USKOKVIC, R. BARMER (1981):

Synthesis and structure proof of a vitamin D metabolite, 25S,26-dihydroxycholecalciferol.

In: Osteoporosis: Recent advances in pathogenesis and treatment.

(Ed. H.F. DeLuca, H.M. Frost, W.S.S. Log, C.C. Johnston,

A.M. Parfitt)

University Park Press, Baltimore, S.487

PAVLOVITCH, J.H., G. COURNOT-WITMER, A. BOURDEAU, S. BALSON,
J.A. FISCHER, G. HEYNEN (1981):

Suppressive effects of 24,25-dihydroxycholecalciferol on bone
resorption induced by acute bilateral nephrectomy in rats.
J. Clin. Invest. 68, 803-810

PEDERSEN, J.I., J. BJÖRKHEM, I. GUSTAFSSON (1979):

26-hydroxylation of C₂₇-steroids by soluble liver
mitochondrial cytochrom P-450.
J. Biol. Chem. 254, 6464-6469

PFLÜGER, H-G. (1986):

Einfluß natürlicher und synthetischer Vitamin D-Metabolite
auf die Knochencalciummobilisierung beim Hühnerküken.
Vet. Med. Inaugural Dissertation 1986

PHAROAH, M.J. and J.M.N. HEERSCHE (1985):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ causes an increase in the number
of osteoclastlike cells in cat bone marrow cultures.
Calcif. Tissue Int. 37, 276-286

PIKE, J.W., E. SPANOS, K.W. COLSTON, J. MACINTYRE,
M.R. HAUSSLER (1978):

Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and
serum 1,25(OH)₂D₃ in chicks.
Am. J. Physiol. 235, 338-343

PRICE, P.A. (1983):

Osteocalcin.
In: Bone and mineral research annual 1, 157-190
(Ed. W.A. Peck)
Excerpta Medica, Amsterdam,

PUZAS, J.E., R.T. TURNER, M.D. FORTE, A.D. KENNY, D.J.

BAYLINK (1980):

Metabolism of $25(\text{OH})\text{D}_3$ to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ by chick chorioallantoic cells in culture.

Gen. Comp. Endocrinol. 42, 116-122

PUZAS, J.E., R.T. TURNER, G.A. HOWARD, D.J. BAYLINK (1983):

Cells isolated from embryonic intestine synthesize $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 and $24,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in culture.

Endocrinology 112, 378-380

RAISZ, L.G., C.L. TRUMMEL, M.F. HOLICK, H.F. DeLUCA (1972):

$1,25$ -dihydroxycholecalciferol: A potent stimulator of bone resorption in tissue culture.

Science 175, 768-769

RAISZ, L.G. (1981):

Calcium regulation

Clin. Biochem. 14, 209-212

RAMBECK, W.A., H. WEISER, H. ZUCKER (1984):

Biological activity of $1\alpha,25$ -dihydroxyergocalciferol in rachitic chicks and rats.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 54, 135-139

RAMBECK, W.A., R. GORALCZYK, C. TRÖGER, H. ZUCKER (1985a):

Synergistic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in rachitic chicks.

In: Vitamin D (Ed. A.W. Norman)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, 298-299

RAMBECK, W.A. and H. ZUCKER (1985b):

Synergistic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on duodenal CaBP in rachitic chicks and on eggshell weight in japanese quails.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 799-804

RAMBECK, W.A., H. WEISER, W. MEIER, H. ZUCKER (1986):

1,24,25(OH)₃D₃ increases the bioactivity of 1,25(OH)₂D₃.

In: Ninth international conference of calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 405

RAMBECK, W.A., H. WEISER, W. MEIER, H. ZUCKER (1987a):

Synergistic effects of vitamin D metabolites in chicken, quail and rats.

Biochem. Biophys. Res. Commun. , in Druck

RAMBECK, W.A. and O. HOFFMANN (1987b):

In Vorbereitung

REDDY, G.S. and K-Y- TSERNG (1986a):

Isolation and identification of 1,24,25-trihydroxyvitamin D₂, 1,24,25,28-tetrahydroxyvitamin D₂ and 1,24,25,26-tetrahydroxyvitamin D₂: New metabolites of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ produced in the rat kidney.

In: Ninth international conference of calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 400

REDDY, G.S., K-Y. TSERNG, B.R. DeCOSTA, R. RAY, M.F. HOLICK (1986b):

Isolation and identification of 24,25,28-trihydroxyvitamin D₂ and 24,25,26-trihydroxyvitamin D₂: New metabolites of 25-hydroxyvitamin D₂ produced in the rat kidney.

In: Ninth international conference of calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 401

REEVE, L.E., H.K. SCHNOES, H.F. DeLUCA (1978):

Biological activity of 1 -hydroxyvitamin D₂ in the rat.

Arch. Biochem. Biophys. 186, 164-167

REEVE, L.E., Y. TANAKA, H.F. DeLUCA (1983):

Studies on the site of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in vivo.

J. Biol. Chem. 258, 3615-3617

REINHARDT, T.A., J.L. NAPOLI, D.C. BEITZ, E.T. LITTLEDIKE,
R.L. HORST (1981):

A new in vivo metabolite of vitamin D₃: 1,25,26-trihydroxy-vitamin D₃.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 302-307

RIZK, M., J.H. PAVLOVITCH, L. DIDIERJEAN, J.H. SAURAT,
S. BALSON (1984):

Skin calcium-binding protein: Effect of vitamin D deficiency and vitamin D treatment.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 230-237

ROJANASATHIT, S. and J.G. HADDAD (1976):

Hepatic accumulation of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃.

Biochem. Biophys. Acta 421, 12-21

ROWE, D.W. and B.E. KREAM (1982):

Regulation of collagen synthesis in fetal rat calvaria by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. 257, 8009-8015

SATO, T., K. TAKUSAGAWA, N. ASOO, K. KANNO (1984):

Effect of 1 -hydroxyvitamin D₃ on metastasis of rat ascites hepatoma K-231.

Br. J. Cancer 50, 123-125

SCHAADT, O. and H. BOLER (1978):

Loss of bone mineral in axial and peripheral skeleton in aging, prednisone treatment and osteoporosis.

In: Noninvasive bone measurements: Methodological problems.

(Ed. J. Dequeker, C.C.J. Johnston)

JRL Press, Oxford / Washington DC, 207

SCHACHTER, D., J.D. FINKELSTEIN, S. KAWARSKI (1964):

Metabolism of vitamin D. I. Preparation of radioactive vitamin D and its intestinal absorption in the rat.

J. Clin. Invest. 43, 787-796

SEINO, Y., T. SHIMOTSUJI, K. YAMAOKA, M. ISHIDA, T. ISHII,

S. MATSUDA, C. IKEHARA, H. GABUCHI, S. DOKOH (1980):

Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in cords, newborns, infants, and children.

Calcif. Tissue Int. 30, 1-3

SIMPSON, R.U., G.A. THOMAS, A.J. ARNOLD (1985):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and activities in skeletal and heart muscle.

Sixth Workshop on Vitamin D, Merano, Abstract 60

SJÖDEN, G., C. SMITH, U. LINDGREN, H.F. DeLUCA (1985):

1 α -hydroxyvitamin D₂ is less toxic than 1 α -hydroxyvitamin D₃ in the rat.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 178, 432-436

SMITH, E.L. and M.F. HOLICK (1985):

1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates differentiation and 24-hydroxylase activity in cultured human keratinocytes.

Sixth Workshop on Vitamin D, Merano, Abstract 91

SÖMJEN, D., G.J. SÖMJEN, Y. WEISMAN, I. BINDERMAN (1982a):

Evidence for 24,25-dihydroxycholecalciferol receptors in long bones of new born rats.

Biochem. J. 204, 31-36

SÖMJEN, D., I. BINDERMAN, A. HARELL, Y. WEISMAN (1982b):

Biological action of vitamin D metabolites: Induction of growth in developing skeletal tissue.

In: Current advances in selectogenesis (Ed. M. Silberman, H.C. Slavkin), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, Internat. Congress Series 589, 185-192

SÖMJEN, D., I. BINDERMAN, Y. WEISMAN (1983):

The effects of 24R,25-dihydroxycholecalciferol and of 1,25-dihydroxycholecalciferol on ornithine decarboxylase activity and on DNA synthesis in the epiphysis and diaphysis of rat bone and in duodenum.

Biochem. J. 214, 293-298

SPANOS, E., J.W. PIKE, M.R. HAUSLER (1976):

Circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the chicken: Enhancement by injection of prolactin and during egg laying.

Life Sci. 19, 1751-1756

SPENCER, R., M. CHARMAN, P. WILSON, E. LAWSON (1976):

Vitamin D-stimulated intestinal calcium absorption may not involve calcium-binding protein directly.

Nature 263, 161-163

SPENCER, E.M. and O. TOBIASSEN (1981):

The mechanism of action of growth hormone on vitamin D metabolism in the rat.

Endocrinology 108, 1064-1070

STEENBOCK, H., S.W.F. KLETZIEN, J.G. HALPIN (1932):

The reaction of the chicken of irradiated ergosterol and irradiated yeast as contrasted with the natural vitamin D of fish liver oil.

J. Biol. Chem. 97, 249-264

STERN, P.H. (1981):

A monolog on analogs: In vitro effects of vitamin D metabolites and consideration of the mineralization questions.

Calcif. Tissue Int. 33, 1-4 Editorial

SUDA, T., H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES, J.W. BLUNT (1969):

The isolation and identification of 25-hydroxyergocalciferol.

Biochemistry 8, 3515-3520

SUDA, T., H.F. DeLUCA, Y. TANAKA (1970):

Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats.

J. Nutr. 100, 1049-1052

SUDA, T. (1985):

Modulation of cell differentiation and tumor promotion by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.

Sixth Workshop on Vitamin D, Merano, Abstract 67

SUDA, T. (1986):

Cellular mechanism of bone resorption induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.

In: Ninth international conference of calcium regulating hormones and bone metabolism.

Nice / France, Abstract 56

SUNDE, M.L., C.M. TURK, H.F. DeLUCA (1978):

The essentiality of vitamin D metabolites for embryonic chick development.

Science 200, 1067-1069

SUTTON, R.A.L., C.A. HARRIS, N.L.M. WONG, J. DIRKS (1977):

Effects of vitamin D on renal tubular calcium transport.

In: Vitamin D: Biochemical, chemical and clinical aspects related to calcium metabolism.

(Ed. A.W. Norman, K. Schaefer, J.W. Coburn, H.F. DeLuca, D. Fraser, H.G. Grigoleit, D.v. Herrath)

Walter de Gruyter, Berlin / New York, 451-457

TAKASAKI, Y., T. SUDA, S. YAMADA, M. OHMARI, H. TAKAYAMA,

Y. NISKI (1982):

Isolation, identification and biological activity of 25-hydroxy-24-oxovitamin D₃.

J. Biol. Chem. 257, 3732-3738

TANAKA, Y. and H.F. DeLUCA (1971):

Bone mineral mobilization activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D.

Arch. Biochem. Biophys. 146, 574-578

TANAKA, Y. and H.F. DeLUCA (1974):

Stimulation of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Science 183, 1198-1200

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, N. IKEKAWA, M. MORISAKI, N. KOIZUMI (1975a):

Determination of stereochemical configuration of 24-hydroxyl group of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and its biological importance.

Arch. Biochem. Biophys. 170, 620-626

TANAKA, Y., R.S. LORENC, H.F. DeLUCA (1975b):

The role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone in the regulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase.

Arch. Biochem. Biophys. 171, 521-526

TANAKA, Y., L. COSTILLO, H.F. DeLUCA (1977):

The 24-hydroxylation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. 252, 1421-1424

TANAKA, Y., R.M. SHEPARD, H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES (1978):

The 26-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vitro by chick renal homogenates.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 7-13

TANAKA, Y., H.F. DeLUCA, H.K. SCHNOES, N. IKEKAWA, T. EGUCKI (1981a):

23,25-dihydroxyvitamin D₃: A natural precursor in the biosynthesis of 25-hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4805-4808

TANAKA, Y., H.K. SCHNOES, C.M. SMITH, H.F. DeLUCA (1981b):

1,25,26-trihydroxyvitamin D₃: Isolation, identification and biological activity.

Arch. Biochem. Biophys. 210, 104-109

TANAKA, Y., E. ABE, C. MIYaura, T. KURIBAYASHI, K. KONNO (1982):

1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60).

Biochem. J. 204, 713-719

TAYLOR, A.N., J.E. MCINTOSH, J.E. BOURDEAU (1982):

Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium binding protein in renal tubulus of rabbits, rat and chick.

Kidney Int. 21, 765-773

THOMASSET, M., J. REDEL, P. MARCHE, P. CUISINIER-GLEIZES (1978):

Duodenal calcium-binding protein (CaBP) and bone calcium mobilization in response to 24R,25- and 24S,25-dihydroxy-cholecalciferol in intact and nephrectomized rats.

J. Steroid Biochem. 9, 159-162

- THOMASSET, M., R. REDEL, P. MARCHE, P. CUISINIER-GLEIZES (1979):
25(R),26- and 25(S),26(OH)₂D₃: Biological activity in intact and nephrectomized rats. Comparative effects of 1,25-, 24(R),25(OH)₂D₃ and 1,24(R),25(OH)₃D₃.
In: Vitamin D: Basic research and its clinical application. Walter de Gruyter, Berlin / New York, 73-76
- TSAI, H.C. and A.W. NORMAN (1973):
Studies on calciferol metabolism. VIII. Evidence for a cytoplasmic receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the intestinal mucosa.
J. Biol. Chem. 248, 5967-5975
- TSOUKAS, C.D., P.M. PROVVEDINI, S.G. MANOLAGAS (1984):
1,25-dihydroxyvitamin D₃; a novel immunoregulatory hormone.
Science 224, 1438-1440
- TUCKER, G., R.E. GAGNON, M.R. HAUSSLER (1973):
Vitamin D₃-25-hydroxylase: Tissue occurrence and apparent lack of regulation.
Arch. Biochem. Biophys. 155, 47-57
- TURNER, R.T., J.E. PUZAS, M.D. FORTE, G.E. LESTER, T.K. GRAY, G.A. HOWARD, D.J. BAYLINK (1980):
In vitro synthesis of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol by isolated calvarial cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5720-5724
- UNDERWOOD, J.L. and H.F. DeLUCA (1984):
Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization.
Am. J. Physiol. 246, E493-E498
- WARNER, M. (1983):
25-hydroxyvitamin D hydroxylation.
J. Biol. Chem. 258, 11590-11593

WASSERMAN, R.H. and C.S. FULLMER (1983):

Calcium transport proteins, calcium absorption and vitamin D.
Ann. Rev. Physiol. 45, 375-390

WEISMAN, Y., A. YARGAS, G. DUCKETT, E. REITER, A. ROOT (1978):

Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in the nephrectomized
pregnant rat.

Endocrinology 103, 1992-1998

WHITSETT, J.A., M. HO, R.C. TSANG, E.J. NORMAN, K.G. ADAMS (1981):

Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by human placenta
in vitro.

J. Clin. Endocrin. Metab. 53, 484-488

WICHMAN, J.K., H.K. SCHNOES, R.L. HORST, R.M. SHEPPARD, N.A.

JORGENSEN (1979):

25-hydroxyvitamin D₃-26,23-lactone: A new in vivo metabolite
of vitamin D.

Biochemistry 18, 4775-4780

WIENTROUB, S. and A.H. REDDI (1982):

Vitamin D metabolites and enchondral bone development.

In: Current advances in selectogenesis

(Ed. M. Silbermann, H.C. Slavkin)

Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, Inter.

Congress Series 589, 211-217

WILHELM, F. and A.W. NORMAN (1985):

24R,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃
binding to its chick intestinal receptor.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 496-501

WINDAUS, A., F. SCHENCK, F. WERDER (1936):

Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus
7-Dehydro-Cholesterin.

Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 241, 100-103

WONG, R.G., J.F. MYRTLE, H.C. TSAI, A.W. NORMAN (1972):

Studies on calciferol metabolism. V. The occurrence and biological activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol in bone.

J. Biol. Chem. 247, 5728-5735

WONG, R.G. (1984):

Paracrine interactions in bone-secreted products of osteoblasts permit osteoclast to respond to parathyroid hormone.

J. Biol. Chem. 259, 4019-4022

YOON, P.S. and H.F. DeLUCA (1980):

Resolution and reconstitution of soluble components of rat liver microsomal vitamin D₃-hydroxylase.

Arch. Biochem. Biophys. 203, 529-541

Herrn Professor Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. W.A. Rambeck für die stets gewährte Hilfe und die zahlreichen, wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen, die mir bei der Durchführung der Versuche sehr wertvolle Hilfe geleistet haben, insbesondere Frau A. Wetzels für die freundliche Unterstützung und Beratung in technischen Fragen, sowie Fräulein A. Bachhuber und Fräulein E. Diwald und den Kollegen und Kolleginnen B. Wicklein, G. Geyer, W. Eisele, S. Meier, B. Schäfer, S. Geldner, M. Wierich und K. Bruckner.

Ganz besonders danken möchte ich auch Joe Mohn für die phantastische Zusammenarbeit während der Anfertigung dieser Arbeit und für die interessanten Gespräche, die wir im Laufe dieser Zeit des Öfteren geführt haben.

Ebenso möchte ich dem Labor- und Tierpflegepersonal der Abteilung am Oberwiesenfeld für die Hilfe und Beratung danken.

LEBENS LAUF

Maria Margareta Völk, geb. Sappl

02.08.1951	geboren in Bolzwang Vater: Andreas Sappl, Landwirt Mutter: Maria Sappl, geb. Kastenmüller
1957 -1965	Volksschule Degerndorf / Münsing
1965 -1968	Landwirtschaftliche Berufsschule Wolfratshausen Landwirtschaftliche Lehre
1966 -1969	Berufsaufbauschule Bad Tölz
1969 -1975	Arbeit im elterlichen Betrieb
01.03.1974	Heirat mit Josef-Anton Völk
1975 -1979	Kolleg St. Matthias Wolfratshausen
27.06.1979	Abitur
1979 -1985	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
05.08.1985	Staatsexamen
01.10.1985	Beginn der Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation
24.02.1986	Approbation als Tierarzt
01.04.1986-30.09.1986	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfs- kraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungs- physiologie der Ludwig-Maximilians- Universität München

